



Universidad de Buenos Aires  
Facultad de Farmacia y Bioquímica

**"INFLUENCIA DE LAS INTERACCIONES DE *BRUCELLA*  
*ABORTUS* CON LA INMUNIDAD INNATA DEL SISTEMA  
NERVIOSO CENTRAL SOBRE LA INTEGRIDAD DE LA  
BARRERA HEMATOENCEFÁLICA"**

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

*Lic. María Cruz Miraglia*

Director de Tesis: *Dr. Guillermo H. Giambartolomei*

Lugar de trabajo: Instituto de Inmunología, Genética y Metabolismo (INIGEM)  
(UBA-CONICET)

---

Les dedico esta tesis

A mamá y papá.

A mi esposo, Fede.

Porque sin ellos no sería la persona que soy  
y no podría haber logrado todo lo que logré.

## AGRADECIMIENTOS

A Guille porque confió en mi y me dio la oportunidad de crecer en el ámbito profesional, apoyándome y guiándome en el transcurso de estos años. Por sus valiosos y enriquecedores consejos, tanto académicos como personales.

A Vic por su infinita paciencia en contestar cada una de mis dudas. Porque siempre estuvo dispuesta a ayudarme y aconsejarme con mucho cariño, alentándome a superarme día a día.

A Ana, mi compañera de equipo, por escucharme, por brindarme continuamente su apoyo y motivarme a seguir adelante en aquellos momentos de flaqueza. No sólo me llevo el recuerdo de muchas experiencias únicas que compartimos juntas sino que estoy segura que voy a extrañar compartir el escritorio con esta persona excepcional.

A Pau por dedicarme continuamente su tiempo, siempre con una sonrisa. Por estar a mi lado con total predisposición a la hora de encarar nuevas técnicas.

A las chicas del Satz: Aye, Coni y Vir con quienes comparto el día a día en el laboratorio. Con las que bailamos, mateamos y bromeamos para hacer los días más divertidos. A aquellas personas que se han ido pero que compartimos gratos momentos en mis inicios en el laboratorio: Al grupo de Juliana; Lis, Romi y Clara. Principalmente a Clara que me enseñó una parte fundamental de este trabajo: el cultivo primario de astrocitos y microglía.

A Sergio C. Oliveira por brindarnos los ratones KO y recibirme cordialmente en Belo Horizonte. A Miriam, especialmente, por hacer que la estadia en Brasil se sintiera como estar en casa.

A Gutking por cedernos las cepas de *E. coli* y *C. freundii*.

A Kwan Sik Kim por cedernos la línea de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC) con la que hicimos gran parte de este trabajo de Tesis.

A mis amigas del alma, que siempre están presentes en todo lo que hago.

A toda mi familia porque cada uno de ellos marcó de alguna manera mi vida y porque todos ellos en conjunto me mostraron el significado de la familia y el amor incondicional.

A mi esposo, Fede por alegrarse con mis logros y levantarme en mis caídas. Por acompañarme, escucharme y apoyarme. Porque si está a mi lado todo es posible.

## RESUMEN

La invasión del sistema nervioso central (SNC) por bacterias del género *Brucella* resulta en un desorden inflamatorio denominado neurobrucelosis. Evidencias clínicas demuestran que los pacientes que sufren de esta forma de la enfermedad presentan alteraciones funcionales de la barrera hematoencefálica (BHE). **Sin embargo, los mecanismos patogénicos implicados en la activación de la BHE, causada por *Brucella*, no han sido investigados a nivel celular y molecular.**

En este trabajo investigamos el mecanismo a través del cual *B. abortus* transmigra a través de la BHE y accede al SNC; y ahondamos en cómo la respuesta inflamatoria desencadena frente a la bacteria repercute en la integridad de la misma. Presentamos evidencia *in vitro* sobre la capacidad de *B. abortus* de infectar, replicar y activar células endoteliales de microvasculatura cerebral utilizado como modelo la línea celular HBMEC. Además, logramos generar un modelo *in vitro* de trans migración bacteriana, a través del cual pudimos dilucidar que *B. abortus* atraviesa una monocapa de HBMEC utilizando un mecanismo de trans migración facilitada por monocitos infectados denominado "Caballo de Troya". La entrada de la bacteria se ve favorecida por la migración fisiológica de leucocitos infectados hacia el SNC. Desde allí, la bacteria tendría la capacidad de infectar células adyacentes, es decir, células gliales residentes del parénquima cerebral.

Una vez que la bacteria infecta células gliales (astrocitos y microglía), se desencadena una respuesta inmunológica que comprende la secreción de citoquinas inflamatorias. En este trabajo, se estudió la implicancia de estos mediadores inflamatorios en la integridad de la BHE. Demostramos que la secreción de IL-1 $\beta$  por células de la glia cumplía un rol preponderante en la activación de las HBMEC. IL-1 $\beta$  indujo la secreción de la citoquina inflamatoria IL-6 y las quemoquinas, IL-8 y MCP-1 por parte de las HBMEC; y desencadenó un aumento en la expresión de la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1). En el modelo *in vitro* pudimos determinar que la activación de las HBMEC resultó clave en la trans migración tanto de monocitos como neutrófilos. No solamente establecimos la importancia de esta citoquina en la activación de las HBMEC sino que pudimos dilucidar parte del proceso que lleva a la maduración proteolítica de esta citoquina por inflamasomas en las células gliales. Logramos correlacionar la funcionalidad de los inflamasomas AIM2 y NLRP3 con la secreción de IL-1 $\beta$  y la consecuente presencia de infiltrados neutrófilos en el parénquima cerebral en un modelo *in vivo* de infección.

Por otra parte, los resultados de esta tesis demuestran que TNF- $\alpha$  no tuvo implicancia directa sobre la activación de la BHE. En este caso, la secreción de TNF- $\alpha$  se correlacionó a la secreción de MMP-9 por parte de astrocitos. Se indagó en el mecanismo por el cual se produce la secreción de esta enzima proteolítica pudiendo determinar que la

activación de las vías de ERK y p38 de las MAPK serían fundamentales en este proceso dado que la inhibición farmacológica de ambas vías afectó la secreción de MMP-9. Finalmente, logramos darle relevancia clínica a estos hallazgos ya que pacientes con neurobrucelosis presentaron altos niveles de MMP-9 en el LCR. La relevancia patológica de la secreción de MMP-9 podría alterar la estructura de la BHE al degradar los componentes de la lámina basal afectando indirectamente a su integridad.

Los resultados expuestos en esta tesis aportan conocimientos hasta el momento desconocidos sobre la estrategia de entrada de la bacteria al SNC y como desde allí desencadena una respuesta inmune que afecta la integridad de la BHE.

## PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

Parte de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron incluidos en las siguientes publicaciones:

- ***Brucella abortus* induces TNF- $\alpha$ -dependent astroglial MMP-9 secretion through mitogen-activated protein kinases.** Miraglia MC, Scian R, Samartino CG, Barrionuevo P, Rodriguez AM, Ibañez AE, Coria LM, Velásquez LN, Baldi PC, Cassataro J, Delpino MV, Giambartolomei GH. *J Neuroinflammation*. 2013 Apr 12;10:47.
- **Glial Cell-Elicited Activation of Brain Microvasculature in Response to *Brucella abortus* Infection Requires ASC Inflammasome-Dependent IL-1 $\beta$  Production.** Miraglia MC, Costa Franco MM, Rodriguez AM, Bellozi PM, Ferrari CC, Farias MI, Dennis VA, Barrionuevo P, de Oliveira AC, Pitossi F, Kim KS, Delpino MV, Oliveira SC, Giambartolomei GH. *J Immunol*. 2016 May 1;196(9):3794-805.
- **The role of NLRP3 and AIM2 in inflammasome activation during *Brucella abortus* infection.** Marim FM, Franco MM, Gomes MT, Miraglia MC, Giambartolomei GH, Oliveira SC. *Semin Immunopathol*. 2016 Jul 12.

---

**INDICE**

ABREVIATURAS.....	6
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	9
BRUCELOSIS.....	10
Agente etiológico.....	10
Composición de la membrana y estructura antigénica de <i>Brucella</i> spp.....	12
Biología de la bacteria.....	14
Respuesta inmune contra <i>Brucella</i> spp. ....	17
Inmunidad innata.....	17
Inmunidad adaptativa.....	23
Epidemiología.....	25
Diagnóstico y tratamiento.....	26
Vías de transmisión.....	28
Sintomatología.....	29
NEUROBRUCELOSIS.....	32
Diagnóstico diferencial y tratamiento.....	32
Manifestaciones clínicas.....	33
Inmunidad innata del SN.....	34
Patobiología de la neurobrucelosis.....	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	40
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
Cultivo de bacterias.....	43
Componentes bacterianos.....	43
Animales.....	44
Inyecciones estereotáxicas intracraneales.....	44
Histología.....	44
Cultivo celular.....	45
Infección.....	46
Estimulación celular.....	47
Neutralización de citoquinas.....	48
Modelo in vitro de BHE.....	48
Determinación de la concentración de mediadores solubles por ELISA.....	49
Determinación de la actividad gelatinasa por Zimografía.....	50

Determinación de la actividad gelatinolítica neta en condiciones nativas.....	50
Determinación de la expresión de la molécula de adhesión CD54 por citometría de flujo .....	51
Microscopía .....	51
Vías de señalización de las MAPK .....	52
Muestras de pacientes.....	53
Análisis estadístico .....	54
RESULTADOS.....	55
CAPITULO I.....	56
Introducción.....	57
Resultados .....	59
B. abortus es capaz de infectar y replicar en HBMEC.....	59
B. abortus es internalizada activamente por las HBMEC. ....	60
B. abortus induce una activación de las HBMEC. ....	61
B. abortus atraviesa una monocapa polarizada de HBMEC por translocación facilitada en monocitos infectados ("Caballo de Troya"). ....	63
El monocito infectado es fuente de bacteria para una infección de novo en astrocitos. ....	66
Discusión.....	68
CAPITULO II .....	73
Introducción.....	74
Resultados .....	75
El sobrenadante de células gliales infectadas con B. abortus induce la activación de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral. ....	75
TNF- $\alpha$ no se encuentra involucrado en la activación de las HBMEC por las células gliales infectadas con B. abortus. ....	76
La activación de las HBMEC por las células gliales infectadas con B. abortus es mediada por IL-1 $\beta$ . ....	78
La activación de las HBMEC, inducida por la IL-1 $\beta$ secretada por las células gliales, requiere de los inflammasomas AIM2 y NLRP3. ....	81
La citoquina IL-18 no participa como mediador en la activación de las HBMEC. ....	84
TLR2 determina la producción de IL-1 $\beta$ por las células gliales, en respuesta a la infección con B. abortus, con la consecuente activación de las HBMEC. ....	85



La activación de las HBMEC por células gliales infectadas con B. abortus promueve la migración transendotelial de neutrófilos y monocitos.....	87
Los inflammasomas NLRP3 y AIM2 influyen el infiltrado de neutrófilos al parénquima cerebral en presencia de B. abortus in vivo.....	90
Discusión.....	91
CAPITULO III.....	95
Introducción.....	96
Resultados .....	98
La infección de astrocitos con B. abortus induce la secreción de MMP-9. ....	98
La secreción de MMP-9 por astrocitos infectados con B. abortus está mediada por componentes estructurales de la bacteria. ....	99
HKBA y L-Omp19 inducen la activación de las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK. ....	101
Las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK están involucradas en la secreción de MMP-9 y TNF- $\alpha$ por astrocitos estimulados con HKBA o L-Omp19. ....	104
TNF- $\alpha$ es la citoquina responsable de la secreción de MMP-9 por astrocitos murinos.....	107
Pacientes con Neurobrucelosis muestran actividad de MMP-9 en líquido cefalorraquídeo (LCR). ....	108
Discusión.....	110
DISCUSIÓN GENERAL .....	113
CONCLUSIONES FINALES.....	117
BIBLIOGRAFÍA .....	119

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género <i>Brucella</i> .....	11
Tabla 2. Vías de infección por <i>Brucella</i> en el hombre .....	29

## INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1. Composición de la membrana y LPS de <i>Brucella spp.</i> .....	12
Ilustración 2. Biología de la bacteria .....	16
Ilustración 3. Inflamasomas .....	22
Ilustración 4. Modelo de inmunopatogenia de la neurobrucelosis .....	116

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>B. abortus</i> es capaz de infectar y replicar en HBMEC. ....	60
Figura 2. <i>B. abortus</i> es internalizada activamente por las HBMEC .....	61
Figura 3. <i>B. abortus</i> induce la activación de las HBMEC .....	62
Figura 4. <i>B. abortus</i> utiliza el mecanismo "Caballo de Troya" para transmigrar a través de las HBMEC .....	65
Figura 5. Los monocitos infectados son fuente de bacteria para una infección <i>de novo</i> en astrocitos .....	67
Figura 6. El sobrenadante de células gliales infectadas con <i>B. abortus</i> induce la activación de las HBMEC .....	76
Figura 7. La activación de las HBMEC no depende de TNF- $\alpha$ .....	77
Figura 8. CASP-1 y ASC están implicados en la secreción de IL-1 $\beta$ por células gliales infectadas con <i>B. abortus</i> .....	78
Figura 9. La activación de las HBMEC por las células gliales requiere de CASP-1 y ASC .....	79
Figura 10. La activación de las HBMEC por el sobrenadante de células gliales infectadas con <i>B. abortus</i> es mediada por IL-1 $\beta$ .....	80
Figura 11. Los inflamasomas AIM2 y NLRP3 están implicados en la secreción de IL-1 $\beta$ por las células gliales infectadas con <i>B. abortus</i> .....	81
Figura 12. La activación de las HBMEC por las células gliales requiere de NLRP3 y AIM2 .....	83
Figura 13. IL-18 no participa en la activación de las HBMEC. ....	84
Figura 14. TLR2 y TLR4 están implicados en la secreción de IL-1 $\beta$ por las células gliales infectadas con <i>B. abortus</i> .....	85

Figura 15. TLR2 determina la producción de IL-1 $\beta$ por las células gliales, en respuesta a la infección con <i>B. abortus</i> , con la consecuente activación de las HBMEC. ....	87
Figura 16. HBMEC activadas por células gliales promueven la migración transendotelial de neutrófilos y monocitos humanos .....	89
Figura 17. NLRP3 y AIM2 influyen el infiltrado de neutrófilos en el parénquima cerebral. ....	90
Figura 18. <i>Brucella</i> induce la secreción de MMP-9 por astrocitos.....	99
Figura 19. La secreción de MMP-9 por astrocitos infectados con <i>B. abortus</i> está mediada por componentes estructurales de la bacteria.....	101
Figura 20. HBKA induce la activación de la vía Erk1/2 y p38 de las MAPK. ....	102
Figura 21. L-Omp19 induce la activación de la vía Erk1/2 y p38 de las MAPK. ....	103
Figura 22. Erk1/2 y p38 están involucradas en la secreción de MMP-9 por astrocitos estimulados con HBKA o L-Omp19. ....	105
Figura 23. Erk1/2 y p38 están involucradas en la secreción de TNF- $\alpha$ por astrocitos estimulados con HBKA o L-Omp19 .....	106
Figura 24. TNF- $\alpha$ es la citoquina responsable de la secreción de MMP-9 por astrocitos murinos .....	108
Figura 25. Pacientes con Neurobrucelosis muestran actividad de MMP-9 en LCR.....	109

# ABREVIATURAS

aBCV	BCV autofágica
AIM2	del inglés <i>"Absent in melanoma 2"</i>
Ac/s	Anticuerpo/s
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ag/s	Antígeno/s
ASC	del inglés <i>"Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD"</i>
BCV	Vacuola que contiene a <i>Brucella</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BSA	Albúmina sérica bovina
CARD	Dominio de reclutamiento de Caspasa-1
Casp-1	Caspasa-1
CPAs	Células presentadoras de antígenos
DAMP/s	Patrón/es molecular/es asociado/s a daño
DCs	Células dendríticas
DMEM	del inglés <i>"Dulbecco's Modified Eagle's Medium"</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
ds RNA	Ácido ribonucleico doble cadena
EEA1	Antígeno endosomal temprano-1
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzima
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FliC	Filamento no funcional de flagelina
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía
h/s	Hora/s
HBMEC	Células endoteliales de microvasculatura cerebral humana, del inglés <i>"Human brain microvascular endothelial cells"</i>
HKBA	<i>Brucella abortus</i> muerta por calor, del inglés <i>"Heat kill Brucella abortus"</i>
Hsp60	Proteína de choque térmico
IFM	Intensidad de fluorescencia media
IFN	Interferón
IL-	Interleuquina-
kDa	kilo Dalton
KO	del inglés <i>"Knock out"</i>
Lamp-1	Proteína 1 de membrana asociada a lisosoma
LCR	Líquido cefalorraquídeo
LPS	Lipopolisacárido.
LPS-R	Lipopolisacárido de cepas rugosas
LPS-S	Lipopolisacárido de cepas lisas
LRR	Segmentos repetitivos ricos en leucina
MAPK	Kinasas de proteínas activadas por mitógenos
MCP-1	Quemoquina quimioattractante de monocitos
ME	Membrana externa
MEC	Matriz extracelular
MHC-I/-II	Complejo mayor de histocompatibilidad/de clase I/de clase II

min	Minutos
MMP/s	Metaloproteasa/s de matriz
MOI/s	Multiplicidad/es de infección
NBD	Dominio de unión a nucleótido
NF- $\kappa$ B	Factor de transcripción nuclear $\kappa$ B
NK	Célula " <i>Natural killer</i> "
NLR/s	Receptor/es de tipo NOD, del inglés " <i>Nod-like receptor</i> "
NLRP	NLR conteniendo dominio PYD
NOD	Dominio de unión y oligomerización de nucleótidos
Omp/s	Proteína/s de membrana externa
Pam3Cys	N-palmitol-S
PAMP/s	Patrón/es molecular/es asociado/s a patógeno/s
PBMCs	Células mononucleares derivadas de sangre periférica
PBS	Buffer fosfato salino
PE	Ficoeritrina
PFA	Paraformaldehído
PMA	Forbol miristato acetato
PMN	Células polimorfonucleares
PrPc	Proteína celular priónica
PRR	Receptor de reconocimiento de patrones
PYD	Dominio pirin N-terminal
rBCV	BCV replicativa
RE	Retículo endotelial
RMN	Resonancia magnética
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil-sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SN	Sobrenadante
SN/C/P	Sistema nervioso /Central /periférico
ssRNA	Ácido ribonucleico simple cadena
T4SS	Sistema de secreción de tipo IV
TC	Tomografía computada
Th	Linfocito T " <i>helper</i> "
TIMP/s	Inhibidor/es tisular/es de metaloproteasas
TLR/s	Receptor/es de tipo Toll, del inglés " <i>Toll-like receptor</i> "
TNF	Factor de necrosis tumoral
UFC	Unidades formadoras de colonias
UNV	Unidad neurovascular
WT	del inglés " <i>Wild type</i> "

# INTRODUCCIÓN GENERAL

## BRUCELOSIS

La brucelosis es una enfermedad cosmopolita causada por bacterias del género *Brucella*. Es considerada la zoonosis bacteriana más común a nivel mundial con más de 500.000 nuevos casos por año [1]. En la Argentina, la enfermedad es endémica a pesar de contar con un Programa Nacional de Control y Erradicación de Brucelosis. Se ha estimado que las pérdidas económicas anuales debidas a esta infección rondan los US\$ 60.000.000 [2]. La persistencia de esta enfermedad no solo limita las posibilidades del sector pecuario y la comercialización internacional, influyendo negativamente en la rentabilidad de las explotaciones y en la calidad de los productos sino que también repercute en el consumo y en la salud pública [3].

### Agente etiológico

Las bacterias, causantes de la infección, son cocobacilos pequeños Gram negativos, aerobios estrictos y de crecimiento lento. Se consideran bacterias inmóviles ya que carecen de un flagelo funcional aunque se puede vislumbrar un vestigio de esta estructura [4]. No presentan cápsulas ni tampoco forman esporas [5]. Son microorganismos resistentes a la desecación, pudiendo permanecer viables durante largo tiempo en el ambiente. Cuando infectan a un hospedador, su nicho preferencial es el intracelular. Principalmente, residen dentro de células del sistema reticuloendotelial y los tejidos asociados, donde son capaces de sobrevivir y multiplicarse. A diferencia de muchas otras bacterias, su genoma está constituido por 2 cromosomas circulares y carece de plásmidos [5].

Al género *Brucella* se lo clasifica taxonómicamente dentro de la clase  $\alpha$ -proteobacteria, orden Rhizobiales, familia Brucellaceae. Es un género que aún en la actualidad continúa en expansión. Históricamente constaba de 6 especies clásicas: *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. canis* y *B. ovis*, cada una de las cuales fue clasificada de acuerdo a variaciones antigénicas y a su hospedador preferencial (Tabla 1). En el año 2007 se incorporaron 2 nuevas especies al género aisladas de mamíferos marinos: *B. pinnipediae* y *B. ceti* [6, 7]. En 2008 se reportaron otras 2 nuevas especies: *B. microti*, aislada en un primer momento de ratones salvajes [8] que fue posteriormente encontrada también en zorros rojos [9] y como contaminante en el suelo [10]; y una cepa inusual de *Brucella* denominada BO1. Esta última cepa fue aislada de un implante mamario infectado de una mujer de 71 años con síntomas de brucelosis. Recién en el año 2010 esa misma cepa, fue diferenciada molecularmente del resto de las especies y propuesta como una nueva especie denominada *B. inopinata* [11, 12]. Ese mismo año se aisló la cepa de



*Brucella* BO2 de un paciente con enfermedad pulmonar crónica que poseía gran similitud con *B. inopinata* [13]. En el año 2014 se estableció una nueva especie, *B. papionis*, que fue aislada a partir de crías nacidas muertas de mandriles [14]. Finalmente, en el año 2015 se introdujo la última especie denominada *B. vulpis*. Esta, fue aislada de nódulos linfáticos mandibulares de 2 zorros rojos en Austria y fue destinada a un clado diferente ya que no pudo ser incluida en ninguna de la especies anteriormente descritas [15].

Especie	Hospedador preferencial	Aspecto de las colonias de acuerdo a la expresión del LPS	Nivel de patogenicidad en humanos
<i>B. melitensis</i>	Caprinos , Ovinos y Camélidos.	Cepa lisa (LPS-S)	Elevada. Causa más común de brucelosis humana.
<i>B. suis</i>	Porcinos.	Cepa lisa (LPS-S)	Moderada.
<i>B. abortus</i>	Bovinos y camélidos.	Cepa lisa (LPS-S)	Moderada a elevada. Segunda causa de brucelosis humana.
<i>B. neotomae</i>	Roedores.	Cepa lisa (LPS-S)	No reportada.
<i>B. canis</i>	Caninos .	Cepa Rugosa (LPS-R)	Moderada.
<i>B. ovis</i>	Ovinos.	Cepa Rugosa (LPS-R)	No reportada.
<i>B. pinnipedialis</i>	Pinnipedos.	Cepa lisa (LPS-S)	Moderada. Reportes de manifestaciones complicadas (Neurobrucelosis).
<i>B. ceti</i>	Cetáceos.	Cepa lisa (LPS-S)	
<i>B. microti</i>	Roedores.	Cepa lisa (LPS-S)	No reportada.
<i>B. inopinata</i>	Desconocida.	Cepa lisa (LPS-S)	No reportada. Aislada de 2 casos humanos.
<i>B. papionis</i>	Mandriles.	Cepa lisa (LPS-S)	No reportada.
<i>B. vulpis</i>	Zorros rojos.	Desconocido	No reportada.

Tabla 1. Especies del género *Brucella*

De todas las especies descritas hasta el momento, *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* y *B. canis* son patógenas para el hombre siendo las 3 primeras responsables de la mayor cantidad de casos de brucelosis humana [16, 17]. Recientemente se reconoció el potencial zoonótico de las especies marinas y su correlación para adquirir manifestaciones focalizadas en el sistema nervioso central (SNC) dado que se pudo identificar a ambas cepas marinas en 2 pacientes que padecían neurobrucelosis y presentaban granulomas intracerebrales [18].

En los últimos años, se han logrado secuenciar la mayoría de los genomas de las especies de *Brucella* y esto permitió demostrar que el género es altamente homogéneo. Si bien, los genomas de las 6 especies clásicas de *Brucella* tienen una homología mayor al 90% [5], se desestimó la posibilidad de considerarlas como parte de una sola especie, imponiéndose la clasificación en distintas especies de acuerdo, principalmente, al hospedador preferencial (Tabla 1).

### **Composición de la membrana y estructura antigénica de *Brucella* spp.**

Al igual que el resto de las bacterias Gram negativas, la envoltura celular de las bacterias del género *Brucella* está formada por una membrana interna, una membrana externa (ME) y un espacio periplasmático intermedio (Ilustración 1). En este espacio están concentradas enzimas y proteínas relacionadas con el transporte de solutos y un gel glucopéptidico denominado peptidoglicano, responsable de la forma e integridad osmótica de la bacteria.

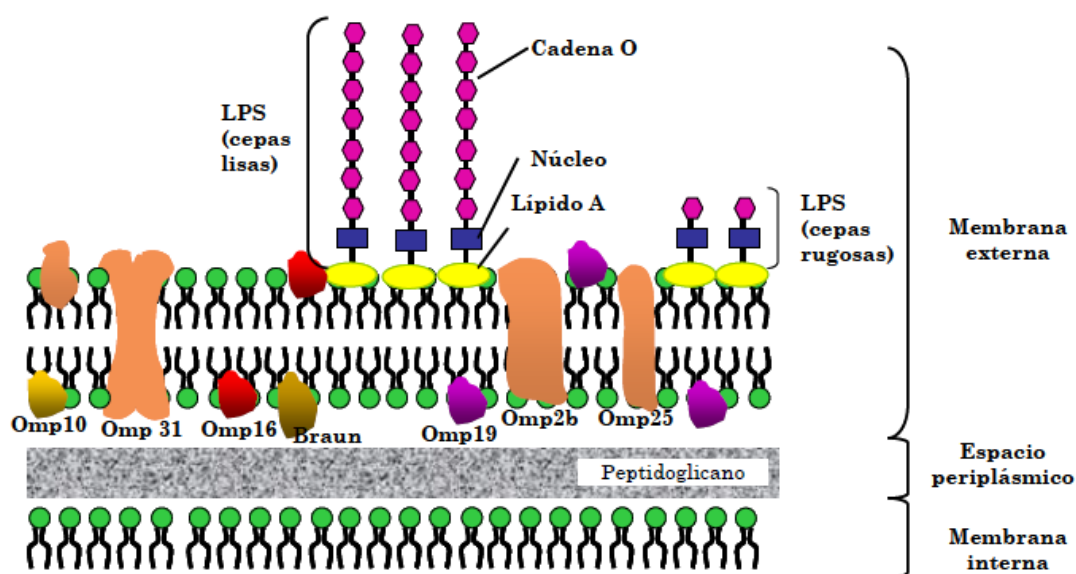


Ilustración 1. Composición de la membrana y LPS de *Brucella* spp.

La ME de *Brucella* contiene proteínas, fosfolípidos y lipopolisacárido (LPS), considerado este último, como el principal antígeno en las bacterias Gram negativas [19]. El LPS es una molécula anfipática que consta de una parte exclusivamente polisacáridica, dirigida hacia el exterior, y otra parte glucolípídica (lípido A) inserta en la ME, por lo tanto no expuesta a la superficie. La parte polisacáridica del LPS se divide en 2 secciones: un oligosacárido intermedio, llamado núcleo; y un oligosacárido O, llamado también, cadena O (Ilustración 1). De acuerdo a la expresión del LPS, las colonias pueden adquirir distinto

aspecto cuando son cultivadas en un medio sólido y de esta manera, ser clasificadas en cepas lisas, S (del inglés "*Smooth*"), o cepas rugosas, R (del inglés "*Rough*"). La porción polisacáridica del LPS se expresa de manera intacta y está expuesta en las cepas lisas (LPS-S) o ausente (o presente con pocos residuos) en las cepas rugosas (LPS-R). A su vez existe una relación entre el tipo de colonia que forman y la virulencia. Las cepas lisas, que poseen la expresión intacta del LPS-S, son más virulentas con respecto las cepas rugosas [20, 21]. Dentro de las primeras se encuentran *B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. neotomae*, *B. pinnipediae*, *B. ceti*, *B. microti*, *B. inopinata* y *B. papionis* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis* (Tabla 1). El lípido A se encuentra inmerso en la capa lipídica y actúa como soporte o unión del resto de la molécula a la superficie bacteriana. El lípido A del LPS de *Brucella*, a diferencia del de la mayoría de las enterobacterias, posee una estructura atípica caracterizada por su alta hidrofobicidad y por poseer cadenas de ácidos grasos más largas [19].

Las bacterias del género *Brucella* poseen ciertas diferencias con respecto a la composición de la membrana celular de otras bacterias Gram negativas. En primer lugar, las características químicas, físicas y biológicas de la estructura del LPS difieren cuantitativamente y cualitativamente del LPS "clásico" de las enterobacterias como *E. coli* [22, 23]. A diferencia de otras endotoxinas, el LPS de *Brucella* no es pirogénico, no induce una reacción de Shwartzman localizada, no aumenta la sensibilidad del hospedador a la histamina, no activa la cascada del complemento de manera significativa y es un mitógeno muy débil de linfocitos B murinos y humanos. Comparado con el LPS de las enterobacterias, se requieren concentraciones 100 a 1000 veces más altas de LPS de *Brucella* para inducir muerte por shock endotóxico. Además, la alta hidrofobicidad de las cadenas largas de polisacáridos podría favorecer la agregación del LPS y, de esta manera, impedir la acción de los péptidos policatiónicos como una estrategia más de resistencia a los sistemas bactericidas [24]. Por lo tanto, la estructura química atípica del LPS le confiere, a este grupo de bacterias, la capacidad de beneficiar la supervivencia y replicación de la bacteria [24].

Asociadas al LPS y formando parte de la ME se encuentran proteínas de la membrana externa (Omps), muchas de las cuales han sido caracterizadas desde el punto de vista genético, inmunológico, estructural y funcional [25]. Estas proteínas pueden clasificarse en 3 grupos de acuerdo a su peso molecular: grupo 1 (89 y 94 kDa); grupo 2 (35 y 40 kDa) y grupo 3 (25 y 34 kDa). Las proteínas de los grupos 2 y 3 se encuentran en mayor cantidad y son conocidas como Omp "principales" [26, 27]. Tibor y col. han demostrado que las Omp 10, 16 y 19 son lipoproteínas [28]. Estos 3 grupos de proteínas se encuentran expuestos en la membrana externa, y son reconocidos por el sistema inmune en

el curso de la infección [29]. A través de diversos estudios se ha confirmado la inmunogenicidad de las Omps y su posible utilidad como vacunas [30].

La ME de *Brucella* forma una bicapa más estable que la de otras bacterias Gram negativas, debido tal vez, a una mayor presencia del lípido fosfatidilcolina en la composición de su ME en comparación a fosfatidiletanolamina en otras bacterias Gram negativas. Si bien la inactivación de *Brucella* por calor causa el colapso de la membrana interna, la ME mantiene su morfología intacta lo que sugiere que la ME de *Brucella* posee una mayor rigidez en comparación a la de otras bacterias Gram negativas [31].

## **Biología de la bacteria**

### *Adhesión, invasión e infección bacteriana*

La susceptibilidad de los humanos a la infección por *Brucella*, está íntimamente ligada al contacto con animales infectados como así también por consumo de alimentos contaminados provenientes de animales infectados. Por lo tanto, *Brucella* puede acceder al organismo a través de las vías conjuntival, inhalatoria, gástrica (transmigando a través de los epitelios mucosos) [32] o dérmica en la piel lesionada. Posteriormente a adherirse a la superficie de las células del epitelio mucoso, *Brucella* utilizaría un mecanismo del tipo cierre o “Zipper” para su internalización. La unión de la bacteria con las células epiteliales promueve la activación de pequeñas GTPasas que tienen como fin activar la cascada de señalización que culmina con el reordenamiento de las fibras de actina en el citoesqueleto de manera de inducir la reestructuración de la membrana celular en torno a la bacteria y consecuentemente favorecer la endocitosis de la misma. Una vez que *Brucella* transloca a través del epitelio es fagocitada por células fagocíticas residentes [33].

La membrana plasmática posee regiones específicas ricas en colesterol denominadas “lipid-rafts” o microdominios lipídicos que median la internalización de las cepas lisas de *Brucella* hacia el interior de los macrófagos [34]. Estos mecanismos de adhesión e internalización dependen de la interacción de algunos elementos del patógeno con factores presentes en la célula huésped, por ejemplo, la proteína celular priónica (PrPC) de los macrófagos que se encuentra anclada en los “lipid-rafts”, debe interaccionar con la proteína de choque térmico 60 (Hsp60) presente en la superficie bacteriana. De esta manera, la proteína PrPC podría ser necesaria para la fagocitosis mediada por “lipid-rafts” y consecuentemente para permitir la supervivencia intracelular de *Brucella* [35]. Otro mecanismo involucra a una proteína de superficie bacteriana de 41 kDa que se asocia a residuos de ácido siálico para mediar la adherencia a células epiteliales y macrófagos [36].

Un tercer posible mecanismo requiere de la interacción el receptor Scavenger de clase A con el LPS de *Brucella* [37]. Como se mencionó anteriormente, las cepas lisas y rugosas difieren en la composición de su LPS, particularmente de la cadena O polisacáridica, por lo tanto esta cadena podría ser la responsable de dirigir la entrada a través de los "lipid-rafts", dado que en las cepas rugosas, que carecen de cadena O del LPS, el mecanismo de adhesión e internalización, no involucra a "lipid-rafts" [38]. El mecanismo de entrada pareciera ser clave para la supervivencia de la bacteria en los macrófagos infectados, ya que la disrupción farmacológica de los "lipid-rafts" lleva a una fagocitosis independiente de los mismos y a la posterior eliminación de todas las bacterias fagocitadas [39].

Las bacterias se diseminan a tejidos preferenciales por medio de su tropismo celular, por ejemplo, hacia las células trofoblásticas placentarias en hembras embarazadas, al pulmón fetal, al sistema reticuloendotelial y al tracto reproductivo [33]. Si bien se considera que el nicho intracelular preferencial de las bacterias son las células fagocíticas profesionales (macrófagos y células dendríticas) y los trofoblastos placentarios, también son capaces de infectar fagocitos no profesionales. En este caso, la internalización requiere de gasto de energía, debido a que el empleo de inhibidores del metabolismo energético suprime este proceso. *Brucella* posee un sistema de 2 componentes llamado BvrS/BvrR, el cual codifica para un sensor de histida kinasa que controla la expresión de los determinantes moleculares necesarios para la invasión celular [40].

La bacteria, además, tiene la capacidad de infectar otros tipos celulares como células endoteliales, osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, células estrelladas hepáticas, linfocitos B y T y células del sistema nervioso [41-48].

### *Replicación intracelular*

Una vez en el interior de las células fagocíticas mononucleares, la bacteria reside en una vacuola especial denominada vacuola que contiene a *Brucella* (BCV), la cual interactúa con las vías endocítica y secretoria para asegurar la supervivencia de la bacteria dentro de las células que infecta. A medida que la BCV va transitando por los distintos estadios va adquiriendo secuencialmente marcadores de endosomas tempranos, como el antígeno endosomal temprano 1 (EEA1) y Rab5. Estas acciones ocurren inmediatamente luego de la internalización y son transitorias. Durante esta etapa hasta un 90-99% de los microorganismos fagocitados son eliminados, mientras que las bacterias que logran sobrevivir, se replican. Posteriormente la BCV adquiere marcadores de endosomas tardíos, como Rab7. *Brucella* evade la destrucción intracelular inhibiendo la fusión de la BCV con los lisosomas. La acidificación de la BCV es importante para la correcta maduración del

compartimiento replicativo [33, 49]. La disminución del pH de la BCV facilita la expresión de genes que son necesarios para la supervivencia y división intracelular de *Brucella*. El factor de virulencia más importante que se induce por la acidez del medio es el sistema de secreción tipo IV (T4SS), el cual está codificado por los genes *virB1-virB12* correspondientes al operon *VirB* presentes en el cromosoma II [50, 51]. La biogénesis y el tráfico de la BCV es regulada por las proteínas bacterianas efectoras que son secretadas por este T4SS [52]. Si bien este sistema no es fundamental para la invasión, la diseminación sistémica o el establecimiento de la infección inicial es esencial para la persistencia [53]. Mutantes que carecen de cualquiera de los genes *virB* son incapaces de replicar intracelularmente [54]. El compartimiento replicativo (rBCV) adquiere transitoriamente el marcador LAMP-1 (proteína 1 de membrana asociada a lisosoma) y posteriormente adquiere calreticulina, un marcador de retículo endotelial (RE). La cooptación de membranas y componentes del RE por parte del rBCV se acompaña de una fuerte reorganización tanto estructural como funcional del RE [55]. En este punto, se lleva a cabo la replicación de *Brucella* dentro del rBCV precediendo a la adquisición de varias proteínas autofágicas, como por ejemplo Beclin 1. Finalmente, ésta BCV expresando características autofágicas (aBCV), vuelve a entrar en la vía endocítica para completar su ciclo de vida intracelular. En esta etapa, la BCV vuelve a ser positiva para el marcador LAMP-1, envuelve a varias bacterias a la vez y posee múltiples membranas. Se postula que la formación de esta BCV autofágica sería necesaria para promover la liberación de las bacterias y contribuir a la diseminación de la bacteria hacia células adyacentes (Ilustración 2) [56]. Así, el macrófago se transforma en el nicho replicativo de bacterias viables estableciendo la cronicidad característica de la infección.

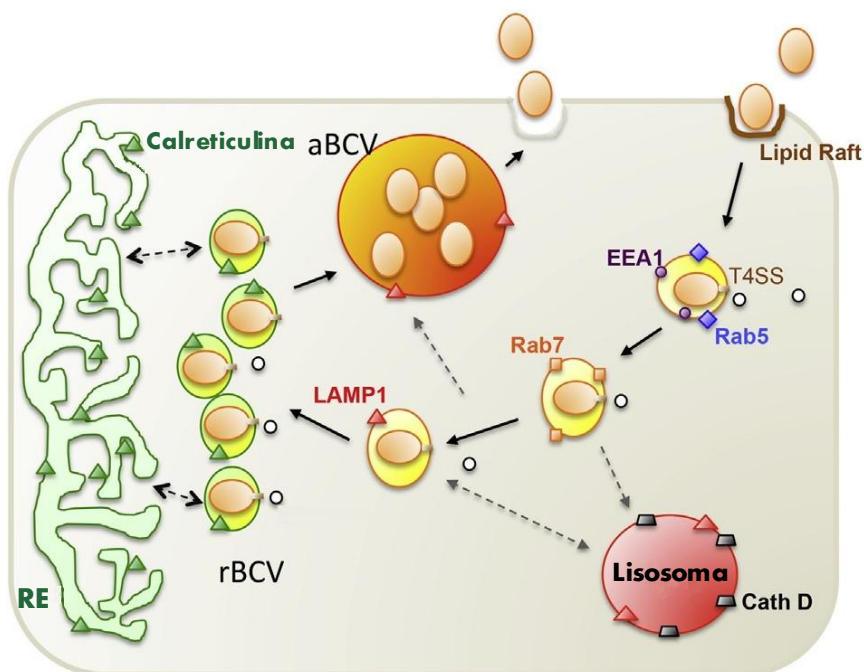


Ilustración 2. Biología de la bacteria modificado de (33).

## Respuesta inmune contra *Brucella* spp.

### *Inmunidad innata*

La inmunidad innata constituye la primera línea de defensa frente a patógenos invasivos y es esencial tanto en la detección como en la eliminación de microorganismos patógenos. Dentro de sus componentes se incluyen barreras anatómicas (la piel y epitelios internos), poblaciones celulares tales como los fagocitos (monocitos/macrófagos, células dendríticas (DCs) y neutrófilos), y las células linfoides innatas (células “*natural killer*” (NK) y células T  $\gamma\delta$ ) y moléculas secretorias (citoquinas y quemoquinas, el sistema del complemento y distintas opsoninas).

#### *Células de la inmunidad innata*

Los macrófagos juegan un papel fundamental en la inmunidad frente a *Brucella*. Como fue mencionado anteriormente, el nicho preferencial de *Brucella* son las células fagocíticas, en particular los macrófagos. Estas células cumplen un papel dual en la infección frente a *Brucella*: por un lado, permiten la replicación y supervivencia de las bacterias durante las etapas tempranas de la infección; no obstante, en los estadios tardíos y, en particular una vez que se estableció la inmunidad adaptativa, los macrófagos activados son los principales responsables de la eliminación de *Brucella*. Esta actividad bactericida reside en la capacidad de estas células de realizar el estallido respiratorio mediante la generación de intermediarios reactivos del oxígeno y nitrógeno. Dicho mecanismo de eliminación bacteriana es dependiente de la opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento. También depende de la activación celular por citoquinas como interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) y, en menor medida, por el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) que puedan producir otras células [57].

La función de los neutrófilos o células polimorfonucleares (PMN) en la inmunidad contra *Brucella* es controversial. En nuestro laboratorio se demostró que *B. abortus* es capaz de activar a esta población en humanos y prolongar su sobrevivencia *in vitro*. Este efecto es mediado por las lipoproteínas de la membrana externa de *Brucella* y estaría asociado a la patogénesis de la brucelosis ya que contribuiría al daño tisular y a la inflamación localizada [58]. Algunos autores proponen que el aumento de la supervivencia de la bacteria dentro de esta población celular estaría relacionada a la capacidad de *Brucella* de inhibir la degranulación de los gránulos primarios en modelos bovinos [59]. Contradictoriamente, Barquero-Calvo y col, exponen que *B. abortus* promueve la muerte temprana de células

PMN [60]. El rol de los neutrófilos en el control de la brucelosis *in vivo* también es controversial. Por un lado, se demostró que estas células no parecieran tener un rol significativo en la eliminación de *Brucella* en las etapas tempranas de la infección en ratones [61] y de manera opuesta, la depleción de neutrófilos permite la eliminación de las bacterias de manera más eficiente durante los estadios tardíos de la enfermedad, demostrando que estas células PMN participan activamente en circuitos regulatorios de la inmunidad innata y adaptativa [62].

Por su parte, las DCs humanas y murinas son susceptibles a la infección por *Brucella* [63-65]. A su vez, en nuestro laboratorio se demostró que la infección con *B. abortus* induce la expresión de las moléculas CD86, CD80, CCR7, CD83, moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de clase I (MHC-I) y clase II (MHC-II), y CD40 en DCs, como también la secreción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-12. No sólo eso, sino que las lipoproteínas de la membrana externa de *B. abortus* serían las que inducen la maduración de estas células generando una respuesta inmune adaptativa de tipo Th1 [66].

Con respecto a las células linfoides innatas, la función de las células NK en el control de la infección es contradictoria. Por un lado, estas células no tendrían un rol crucial en el control de la brucelosis murina dado que tanto los ratones susceptibles BALB/c, como los resistentes C57BL/10 controlan la infección por *B. abortus* 2308 en ausencia de células NK [67]. Esta observación tiene su correlato en humanos, ya que en pacientes con brucelosis, la actividad de las células NK se encuentra aparentemente suprimida mostrando una disminuida actividad citotóxica [68]. Por otro lado, algunos autores demostraron que las células NK parecen ser importantes para la activación de linfocitos B y la consecuente producción de anticuerpos [69], como así también en la producción de IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  por macrófagos infectados con *B. suis* cuando son co-cultivados ambos tipos celulares *in vitro* [70].

Las células T  $\gamma\delta$  también cumplirían una importante función en la inmunidad frente a *Brucella*. El número de células T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 aumenta en sangre periférica de pacientes con brucelosis aguda y declina luego de un tratamiento exitoso [71, 72]. Por otra parte, ratones deficientes en células T  $\gamma\delta$  poseen una aumentada susceptibilidad a la infección con *B. abortus*, lo cual se relacionó a una falla en la inmunidad innata desarrollada por estos ratones frente a dichas bacterias, lo que sugeriría que la función protectora de estas células transcurre durante los estadios tempranos de la enfermedad [73]. Asimismo, células T  $\gamma\delta$  activadas por antígenos (Ags) no peptídicos controlan el número de bacterias intracelulares debido a que secretan TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  activando las funciones bactericidas del macrófago. Estudios *in vitro* sugieren que las células T V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 también serían capaces de lisar a las



células infectadas, ya sea por contacto directo o de manera indirecta a través de la secreción de un factor bactericida denominado catelicidina LL-37 [74, 75].

### *Receptores de la inmunidad innata*

Los mecanismos de defensa frente a patógenos comienzan con el reconocimiento de diversos productos microbianos o patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) a través de los receptores de reconocimiento de patrones (PRR). Existen diferentes clases funcionales de PRR responsables del censado microbiano, tales como receptores de tipo Toll (TLRs) y receptores de tipo NOD (NLRs) entre otros [76].

Los TLRs son receptores transmembrana que están presentes en células fagocíticas profesionales, principalmente en monocitos, macrófagos, DCs y neutrófilos. Reconocen los distintos PAMPs uniéndose directamente a ellos y reclutan un grupo de adaptadores intracelulares con dominios TIR. De esta manera desencadenan cascadas de señalización que van a culminar con la activación de MAP kinasas y factores de transcripción (como el factor de transcripción nuclear  $\kappa B$ , NF- $\kappa B$ ) que modulan la producción de citoquinas, quemoquinas y expresión de moléculas co-estimuladoras. Los TLRs pueden ser activados por diversos productos microbianos: TLR2 (formando heterodímeros con TLR1 o TLR6) reconoce productos de la pared celular de bacterias Gram positivas y lipoproteínas bacterianas, TLR3 reconoce dsRNA, TLR4 es activado por LPS, TLR5 es activado por flagelina, TLR9 por motivos CpG no metilados y TLR7/8 por ssRNA [77]. La localización subcelular de los TLRs se correlaciona con la naturaleza de sus ligandos. TLR1, 2, 4, 5 y 6 están presentes en la membrana plasmática, mientras que TLR3 (dsRNA), 7, 8 (ssRNA) y 9 (motivos CpG no metilados) se expresan en la membrana de los endosomas [77, 78].

Como la mayoría de las bacterias Gram negativas, la membrana externa de *Brucella* está compuesta por una gran cantidad de PAMPs que podrían ser reconocidos por receptores de la inmunidad innata. Es por esto, que el rol de los TLRs en la resistencia contra la infección por *Brucella* ha sido intensamente estudiado durante estos últimos años [79]. Estudios realizados por nuestro grupo, han demostrado que la señalización a través de TLR2 contribuye a la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de las células inmunes innatas [80]. Además, el reconocimiento a través del heterodímero TLR2/TLR6 es primordial para la secreción de la citoquina TNF- $\alpha$  por parte de DCs derivadas de médula ósea [81]. Si bien, algunos autores vinculan a los receptores TLR2 y TLR4 con la secreción de TNF- $\alpha$  durante la infección, mencionan que estos receptores no serían esenciales para la eliminación del patógeno [82]. Otros autores, publican resultados contrapuestos, dado que muestran que el receptor TLR4 sería esencial para controlar la infección [83]. De todas

maneras, el LPS, ligando de TLR4, se considera atípico en *Brucella*, ya que tiene un grado muy bajo de actividad biológica. Se ha demostrado que la producción de mediadores inflamatorios es entre 3 y 4 órdenes de magnitud menor que el LPS convencional de las enterobacterias [84, 85]. Con respecto al rol de TLR9, se describió que a través de este receptor se reconocen motivos CpG derivados de ADN de *Brucella* y que la activación de la respuesta inmune innata desencadenada cumpliría un rol importante en el control inicial de la infección por la bacteria [86]. Se describió, además, que la señalización a través de este receptor es fundamental para la secreción de la citoquina IL-12 en DCs estimuladas con la bacteria muerta por calor (HKBA) [87, 88]. En el caso de TLR5, el filamento no funcional de flagelina de *Brucella* (FliC) no funciona como un verdadero agonista de TLR5, otorgándole, a la bacteria, la capacidad de evadir la respuesta mediada por este receptor [89, 90].

Estudios recientes han revelado las cascadas de señalización intracelulares que participan en el inicio de la respuesta inmune mediada por TLRs en la infección por *Brucella* [91]. Los receptores TLR2, TLR4 y TLR9 han sido implicados en las interacciones del hospedador con *Brucella* y las vías de señalizaciones implicadas en la activación de la respuesta inmune innata por parte de la bacteria son dependientes de la presencia del adaptador MyD88 e independientes de la presencia del adaptador TRIF. Se describió que ratones deficientes en MyD88, adaptador común a todos los TLRs menos TLR3, son más susceptibles a la infección con *Brucella*. Además, estos ratones presentan defectos en la maduración de DCs y ausencia de producción de IL-12 y TNF- $\alpha$  por los macrófagos y DCs en respuesta a *Brucella* [82, 92].

*Brucella* también interferiría con la señalización vía TLRs por la producción de homólogos del dominio del receptor Toll/IL-1 (TIR) inhibitorios. Se han descrito 2 proteínas de *Brucella* homólogas (Btp1 y TcpB) identificadas en *B. abortus* y *B. melitensis* respectivamente que estarían asociadas al sistema de secreción de tipo IV funcional y que interfieren en la señalización por TLR2 y TLR4 dado que inducen la ubiquitinización y degradación de la molécula adaptadora MAL/TIRAP [93]. La proteína Btp1 de *B. abortus* actuaría en la señalización vía TLR2, inhibiendo la maduración de DCs y la secreción de citoquinas proinflamatorias [64]. La proteína TcpB de *B. melitensis*, interactuaría también con el adaptador MyD88 impidiendo la señalización por vía TLR2 y TLR4 y la secreción de citoquinas proinflamatorias [94]. Btpb sería otra de las proteínas que inhiben la señalización vía MyD88 relacionándose a la evasión inmune producida como mecanismo de supervivencia [95]. Estas proteínas, podrían ser una nueva clase de factores de virulencia que actuarían inhibiendo la señalización vía TLRs y/o MyD88, y de esta manera disminuyendo la respuesta inmune innata e incrementando la virulencia.

Los NLRs son una familia de PRR citosólicos responsables del reconocimiento de bacterias intracelulares o patrones moleculares asociados a daño (DAMPs). Todos los miembros que componen esta familia comparten un dominio C-terminal caracterizado por segmentos repetitivos ricos en leucina (LRR) que es responsable, específicamente, de la detección de PAMPs; y un dominio de unión a nucleótido (NBD). De acuerdo a características distintivas en la porción N-terminal, los miembros de NLRs pueden subclasificarse en: los denominados NLRP por poseer un dominio pirin N-terminal (PYD) que consta de 14 miembros, y los que poseen proteínas con dominio de unión y oligomerización de nucleótidos, que consta de 3 miembros, denominados NOD1 (NLRC1), NOD2 (NLRC2) y NLRC4. Luego de la estimulación con un PAMP/DAMP, el NLR específico oligomeriza y recluta pro-caspasa-1 directamente por interacción homotípica con el dominio CARD (dominio de reclutamiento de caspasa-1) (NLRP1 y NLRC4); o indirectamente por acción de una proteína adaptadora ASC (NLRP3). En este último caso, NLRP3 interactúa con ASC vía interacción homotípica de sus dominios PYDs. ASC interactúa posteriormente con pro-caspasa-1 vía interacción homotípica de sus dominios CARDs [96]. NLRP1, NLRP3 y NLRC4 pueden montar complejos multiproteicos denominados "inflammasomas" debido a que desencadenan la activación de caspasas inflamatorias (caspasa-1 y caspasa-11) en respuesta a diversos activadores. La proteína ausente en melanoma 2 denominado AIM2, que censa ADN bacteriano, también tiene la capacidad de conformar inflammasomas a través de la proteína adaptadora ASC [97]. Los NLRs y AIM2 dependerían de la estimulación de los TLRs como primera señal y su función sería orquestar el ensamblaje de inflammasomas que llevarían a la maduración proteolítica de pro-IL-1 $\beta$  y pro-IL18 por acción de caspasa-1 y a la secreción de las citoquinas IL-1 $\beta$ , IL-18 e IL-33 (Ilustración 3) [98].

La secreción de IL-1 $\beta$  tiene un rol protectorio contra la infección con *B. abortus*. Ligandos de *Brucella* activarían los inflammasomas NLRP3 y AIM2 dependientes del reclutamiento de la proteína adaptadora ASC y de esta manera se fomentaría la activación de caspasa-1 y la consecuente respuesta proinflamatoria que contendría el avance de la infección en un modelo murino [99].

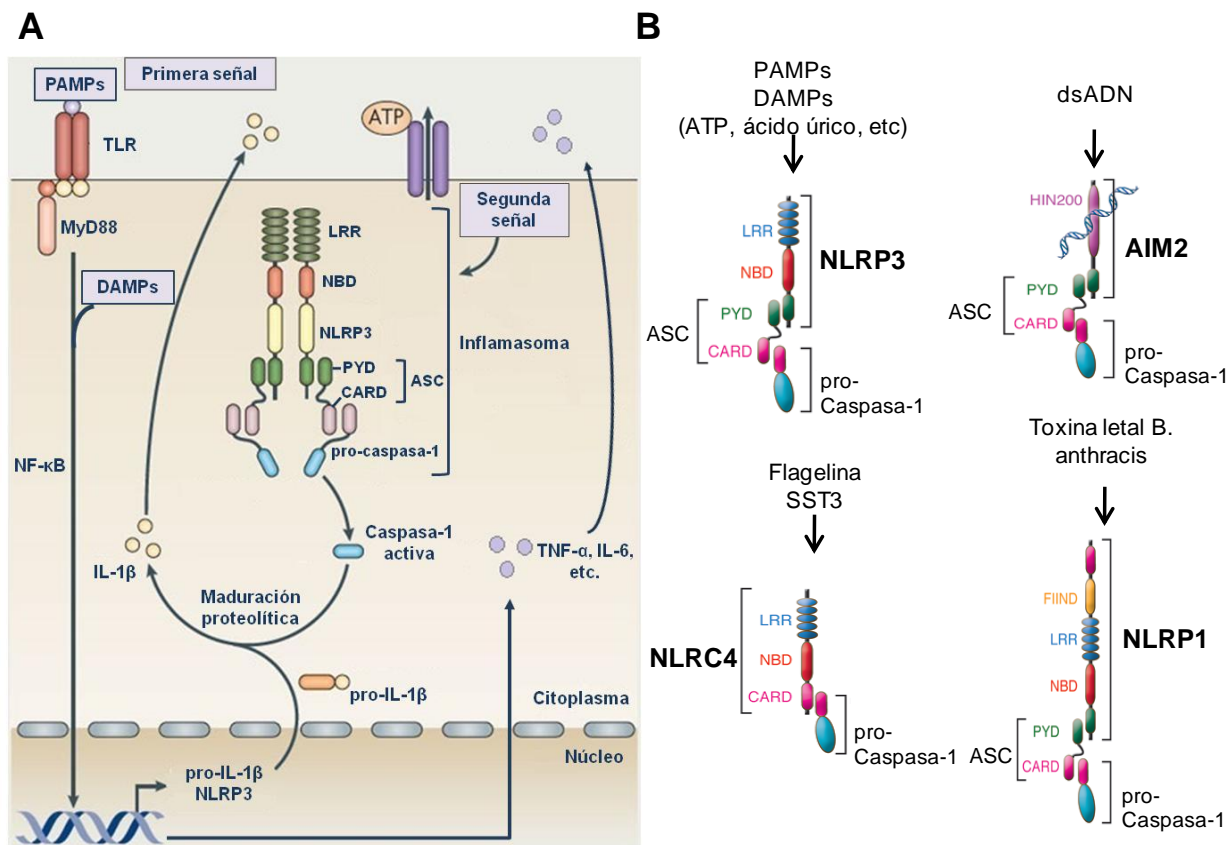


Ilustración 3. Inflammasomas. Esquema de activación del inflammasoma NLRP3 modificado de (98)

(A). Subfamilias de inflammasomas modificado de (96) (B)

### Citoquinas y quemoquinas de la inmunidad innata

La importancia de los receptores de la inmunidad innata es que tienen como función modular la producción de citoquinas y quemoquinas y moléculas co-estimuladoras, y a través de estas, prevenir la replicación bacteriana y reducir el número inicial de bacterias. Durante las etapas tempranas de la infección con *Brucella* una de las primeras citoquinas en ser secretada es el TNF-α [80]. Además, esta citoquina junto con la IL-12 están directamente involucradas en la resistencia a la brucelosis murina [100, 101]. El rol de la IL-12 es decisivo, no sólo porque esta citoquina juega un rol preponderante en la inducción de una respuesta de tipo Th1 con la consecuente producción de IFN-γ, sino también, porque está implicada en el proceso de estallido respiratorio por parte de los macrófagos. Proceso fundamental que contribuye a la eliminación de los patógenos en el cual se liberan especies reactivas del oxígeno. Los esplenocitos provenientes de ratones depletados de IL-12, tienen una menor capacidad de generar la activación de los macrófagos, exacerbando, de esta manera, la infección por *Brucella* [101]. Asimismo, también ha sido reportada la secreción de IL-6, IL-1β e IL-10 por esplenocitos provenientes de ratones infectados con *Brucella* [102]. Más allá de

las mencionadas citoquinas, la infección con *Brucella* de macrófagos y DCs humanos promueve la producción de quemoquinas, entre ellas MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), MCP-1 (CCL2), RANTES (CCL5), Gro- $\alpha$  (CXCL1) e IL-8 (CXCL8) [103].

### ***Inmunidad adaptativa***

Las células del sistema inmune innato contribuyen a controlar la infección, no sólo por su rol como células efectoras, sino también porque inician y orientan el curso de la respuesta inmune adaptativa. La activación de la inmunidad adaptativa y el desarrollo de funciones efectoras de este tipo de inmunidad requiere de la presentación de péptidos microbianos a los linfocitos T CD4+, T CD8+ y linfocitos B que finalmente permitirán la eliminación de los microorganismos y la generación de memoria inmunitaria. En particular, los linfocitos T CD4+ pueden diferenciarse en distintos perfiles (Th1, Th2, Th17 y Treg), los cuales se caracterizan por la producción de diferentes citoquinas y median diferentes funciones inmunitarias, una de ellas implica la cooperación con los otros 2 tipos celulares. Las células de la inmunidad innata (macrófagos y DCs), a través de su habilidad de producir mediadores proinflamatorios (IL-12, IL-23, etc) y expresar determinadas moléculas co-estimuladoras (CD80/CD86, CD40, etc) contribuyen a establecer un perfil determinado. La importancia de la respuesta Th1 reside principalmente en la capacidad de secretar IFN- $\gamma$ . Dicha molécula tiene un rol central en la inmunidad debido a que promueve la activación de las funciones bactericidas del macrófago, la inducción de la expresión de moléculas del MHC y co-estimuladoras en las células presentadoras de antígenos profesionales (CPAs), la estimulación de la citotoxicidad por parte de células T citotóxicas y la potenciación de la muerte de los macrófagos infectados [104].

A pesar de todos los componentes y mecanismos de la inmunidad innata que se activan frente a la infección con *B. abortus*, estos no siempre son suficientes para su erradicación y es absolutamente necesario el desarrollo de una respuesta inmune adaptativa que combata a la infección [105]. Los Ags procesados de *B. abortus* son capaces de ser presentados por moléculas del MHC-I y MHC-II, y de esta manera activar tanto linfocitos T  $\alpha\beta$  CD4+ como linfocitos T CD8+ [106, 107]. Particularmente, en estados tempranos de la infección por *Brucella*, el rol de la respuesta innata es reducir el número inicial de bacterias promoviendo un ambiente adecuado para generar una respuesta adaptativa robusta Th1 en el hospedador [108]. La presencia de IL-12 hace que, durante la infección con *B. abortus*, se genere una poderosa inducción hacia el desarrollo de una respuesta de tipo Th1 que está caracterizada por producir la activación de macrófagos y que contribuye, además, a la activación y expansión de linfocitos T CD8+ citotóxicos [104, 105]. La importancia de las células con perfil Th1 en la respuesta frente a *Brucella* se determinó en primer lugar en el

modelo murino. Diversos estudios demostraron que ratones deficientes en elementos clave de la respuesta Th1 como el IFN- $\gamma$  o la IL-12 eran más susceptibles a la infección, y asimismo se determinó que la administración de estas citoquinas de manera exógena favorecía el desarrollo de una respuesta protectora en dichos ratones [101, 109, 110]. La importancia del IFN- $\gamma$  en la resolución de la infección por *Brucella* fue demostrada en estudios con ratones deficientes en el gen de esta citoquina. Estos ratones mueren 6 semanas después de la infección con *B. abortus* [111]. Más aún, estudios en pacientes con brucelosis también señalan la importancia del desarrollo de una respuesta de tipo Th1 para combatir la infección, ya que existe una correlación entre disminuidas respuestas Th1 y recaídas o estadios crónicos de la enfermedad [112-115], así como una asociación entre determinados polimorfismos o mutaciones genéticas que afectan a este tipo de respuesta y una mayor susceptibilidad a la brucelosis [116]. Otros estudios han sugerido que la activación con IFN- $\gamma$  impide que *Brucella* establezca su nicho replicativo, pero si ya se estableció la BCV, el IFN- $\gamma$  no tiene efecto alguno [117].

A modo de corolario, se pueden resumir en 3 los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa esenciales para el control de la infección por *Brucella*: primero, el IFN- $\gamma$  producido por linfocitos T  $\alpha\beta$  CD4+ y CD8+ activa las funciones bactericidas del macrófago inhibiendo la supervivencia intracelular de las bacterias [109, 110, 118, 119]; segundo, la citotoxicidad mediada por linfocitos T CD8+ tiene como fin eliminar células infectadas mediante la interacción Fas-FasL o la secreción de perforinas y granzimas [106, 120]; y por último, los isotipos de anticuerpos (Acs) de tipo Th1 como IgG2a e IgG3 opsonizan al patógeno y facilitan su fagocitosis [121].

*Brucella* recurre a mecanismos por los cuales intenta evadir también la inmunidad adaptativa y persistir en el hospedador. Principalmente estos mecanismos de evasión implicarán disminución de la presentación antigénica a través de las MHC-I y MHC-II y la consecuente disminución de las funciones efectoras de linfocitos T  $\alpha\beta$  CD4+ y CD8+ [122-124]. Otros mecanismos de evasión de la respuesta inmune adaptativa por la bacteria implica la inducción de apoptosis de los linfocitos T [47].

La contribución de la inmunidad humoral en la respuesta frente a la brucelosis no ha sido del todo esclarecida. Tempranamente en la infección aparecen anticuerpos (Acs) que suelen permanecer detectables en el suero durante años. Estos Acs están dirigidos contra varios componentes del microorganismo, pero especialmente contra los Ags superficiales, particularmente el LPS. Desde el punto de vista clínico, la detección de Acs dirigidos contra el LPS es útil para el diagnóstico, y seguimiento de la infección. No obstante, si bien la opsonización de las bacterias por Acs aumenta su fagocitosis y por lo tanto, disminuye el

nivel inicial de infección, la naturaleza intracelular de *Brucella* hace que este efecto sea limitado y que de cualquier manera progrese la enfermedad [125, 126].

## Epidemiología

La incidencia y prevalencia de la enfermedad en humanos varía geográficamente y además se encuentra en constante cambio debido a razones sanitarias, socioeconómicas y políticas [127]

Dado que la distribución geográfica de la brucelosis humana está íntimamente relacionada a la distribución de la brucelosis animal, es que algunos países han implementado fuertes programas de erradicación de la brucelosis bovina causada por *B. abortus* disminuyendo, como consecuencia, radicalmente la incidencia en los últimos años. Actualmente solo unos pocos países han sido declarados libres de la enfermedad en animales, lo cual es determinante para la presencia de la enfermedad en humanos. Entre ellos se encuentran Francia, el Reino Unido, los países escandinavos, los Países Bajos, Bélgica, Austria, Suiza, Canadá, Japón, Australia y Nueva Zelanda. Sin embargo, la vigilancia en estos países debe ser continua, ya que por ejemplo se reportaron dos brotes de brucelosis bovina en Francia en 2012 [128].

En América del Norte, el programa Nacional de erradicación de brucelosis bovina empleado en Estados Unidos reflejó un descenso de 6321 casos en 1947 a 100 casos para el año 2001 [128]. Otro es el panorama en Países del Mediterráneo, Asia Central, India, Norte y Este de África que aún en la actualidad no pueden ser considerados libres de brucelosis. La enfermedad inicialmente fue descrita en Malta, donde aún hoy se encuentran casos esporádicos de la enfermedad. Grecia, Turquía y Siria se encuentran entre los países con mayor incidencia anual y en otros países del Medio Oriente y África sub-sahariana la incidencia se encuentra en constante aumento. La enfermedad aún es considerada endémica en Egipto, Irak y Afganistán aunque las estadísticas oficiales en los dos últimos países estén subvaloradas y los esfuerzos para controlarla sean ineficaces; en parte por la guerra y la escasez de recursos. En el último tiempo han emergido dos grandes focos hiperendémicos en países de Asia Central y países de la península Balcánica. Armenia, Azerbaiyán, Georgia, Kirguistán, Uzbekistán, Tayikistán, Turkmenistán y Mongolia se encuentran actualmente dentro de los 25 países con mayor incidencia a nivel mundial. La enfermedad se ha esparcido en esta región y ha llegado a países previamente libres de brucelosis como Bulgaria. Sin embargo, el principal foco de la enfermedad se encuentra en Albania y Macedonia. Además nuevos focos de brucelosis son continuamente reportados, aún en los lugares menos pensados como por ejemplo Corea del Sur [129, 130].

Dentro de América Central y América Latina, México es considerado uno de los reservorios más importantes de brucelosis humana [1]. Conjuntamente con Perú continúan reportando una cantidad considerable de casos anualmente. En Chile, la Décima Región de Los Lagos, principal zona productora de leche, tiene la mayor concentración de ganado infectado [131].

Cabe destacar que la enfermedad está sub-reportada y los números oficiales constituyen sólo una fracción de la verdadera incidencia de la enfermedad. Las razones de esto se asocian a la dificultad en el diagnóstico de la enfermedad. Como consecuencia, la incidencia real de la brucelosis es desconocida [127].

En nuestro país, un estudio realizado en 2014 sobre la brucelosis bovina reveló una prevalencia en animales del 0,8% y una prevalencia de predios del 12,35% para la zona de mayor producción bovina (Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba, Entre Ríos, Corrientes, La Pampa, San Luis, parte de Formosa, Santiago del Estero y Chaco) [3]. La brucelosis por *B. melitensis* bv.1 es altamente endémica en la región del Chaco salteño, Catamarca y en las regiones centro y oeste de la provincia de Formosa.

La continua presencia de la enfermedad en animales constituye un foco de peligro constante para la población. En nuestro país los casos de brucelosis en humanos deben ser notificados y el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE) de la Dirección de Epidemiología del Ministerio de Salud de la Nación informa semanalmente los casos detectados por provincia y regiones sanitarias. El mayor pico de la enfermedad fue registrado en el año 1997 con 687 casos, a partir de ese punto la incidencia comenzó a descender hasta llegar en 2005 a los 300 casos por año en todo el país [132]. En los años subsiguientes el número de casos reportados fue variable pero continuó con la misma tendencia decreciente. A pesar de estos datos, nuevamente se debe reforzar el concepto de que las estadísticas oficiales no reflejan el número real de personas infectadas. Se estima que la verdadera incidencia de la enfermedad sería de 10 a 25 veces más alta que la indicada [132]. En este contexto, los esfuerzos para el control de la enfermedad deben ser constantes.

## **Diagnóstico y tratamiento**

El amplio espectro de manifestaciones clínicas que puede presentar la brucelosis humana y que los síntomas característicos de la enfermedad en la primera etapa no sean patognomónicos, hacen que su diagnóstico sea difícil [40]. Se debe realizar una evaluación integral donde el médico pueda interrogar sobre posible contacto con animales infectados y de esta manera le permita pensar en la posibilidad de brucelosis. Además de considerar la



historia clínica, debe realizarse un estudio bacteriológico complementado con la detección de Acs específicos contra *Brucella* en sangre por seroaglutinación. El diagnóstico de certeza se establece aislando al microorganismo a partir de cultivos de sangre, médula ósea u otros tejidos. Sin embargo, las dificultades propias de la implementación del aislamiento de *Brucella* a partir de los distintos tejidos hacen que los métodos serológicos indirectos sean el recurso diagnóstico más utilizado, aun cuando estos últimos sólo aporten un diagnóstico presuntivo.

También se puede utilizar el diagnóstico por PCR (del inglés "*Polymerase Chain Reaction*") la cual es altamente específica e incluso sirve para distinguir entre las diferentes especies de *Brucella*, pero su costo hace que la seroaglutinación siga siendo la técnica predilecta.

En las formas agudas de la enfermedad, la administración precoz y prolongada de una apropiada combinación de antibióticos provoca la remisión del cuadro clínico en al menos el 90% de los pacientes. El tratamiento recomendado por la Organización Mundial de la Salud para la brucelosis aguda en adultos contempla 2 opciones: ambas incluyen la administración de doxiciclina (200 mg/día) durante 6 semanas, combinada con estreptomicina (750 mg/día) durante 2 a 3 semanas o combinada con rifampicina (600-900 mg/día) durante 6 semanas. Si la enfermedad es diagnosticada tempranamente y se trata en forma adecuada tiene, en general, una evolución favorable.

Hasta el momento, no existen vacunas para humanos que puedan prevenir la infección, por eso, el énfasis debe estar en lograr un efectivo control sanitario de los animales para prevenir y tratar la zoonosis. En la actualidad, la vacunación animal se realiza con cepas vivas atenuadas. Dos cepas vacunales lisas: *B. abortus* cepa 19 (S19) para el ganado vacuno y *B. melitensis* REV-1 para pequeños rumiantes, y una cepa atenuada rugosa: *B. abortus* RB51 para el ganado vacuno [133].

En Argentina la brucelosis humana es una enfermedad que persiste en las regiones donde la infección animal no está controlada [2]. Es por eso que la estrategia de los procedimientos biológico-sanitario de los programas de lucha contra la brucelosis bovina se basan principalmente en: 1) estudios de la prevalencia. (diagnóstico de situación); 2) vacunación (disminución de la susceptibilidad); 3) eliminación de animales enfermos (reducción de la oferta brucélica); 4) pesquisa sanitaria (detección de animales reaccionantes y los rodeos de donde provienen); 5) cuarentena de los rodeos infectados en la etapa erradicativa (se evita el contagio de rodeos sanos) [3]. Además de los programas de saneamiento del ganado, existen otras medidas importantes de prevención a considerar, como ser: educación para la salud en áreas endémicas, medidas de higiene y seguridad en el trabajo y control sanitario en las fronteras.

## Vías de transmisión

La principal fuente de infección para los humanos la constituyen los animales infectados que excretan gran cantidad de bacterias junto con los tejidos y productos de abortos, en la leche y, en menor medida, en las secreciones genitales. Es por eso, que la susceptibilidad a adquirir la enfermedad está íntimamente ligada al contacto directo con fetos abortados o placentas de hembras infectadas; por el contacto con aerosoles como así también por consumo de alimentos contaminados provenientes de animales infectados [134]. Como mencionamos anteriormente, las bacterias del género *Brucella* pueden acceder al organismo a través de las mucosas de las vías conjuntival, respiratoria y digestiva, aunque también puede ingresar por abrasiones en la piel [132, 135]. Debido a su potencial epidémico, la ausencia de una vacuna humana, y la eficiencia de la infección por aerosoles, *Brucella* es clasificada como un patógeno de nivel de bioseguridad 3 y es considerado un potencial agente bioterrorista [136]. En el hombre se pueden distinguir 2 tipos de patrones epidemiológicos: un patrón urbano-alimentario, en el cual se relaciona la infección de humanos al consumo de leche no pasteurizada y sus derivados. El consumo de carne no es una fuente importante de contaminación, dado que la carga bacteriana en los tejidos musculares de los animales es baja, pero se han reportado casos de infección asociados al consumo de bazo e hígado poco cocidos [137]. El segundo patrón, rural-laboral, incumbe a peones de campo, veterinarios o personal de laboratorio que pueden adquirir la enfermedad por contacto con ganado infectado o por contacto con muestras contaminadas [132, 135, 138, 139]. La inoculación accidental, del personal de campo, por las cepas vacunales causa patología dado que, aún atenuadas son consideradas potencialmente patogénicas [140, 141] (Tabla 2). En países en los cuales la infección por *Brucella* es endémica en la población animal, la infección por *Brucella* en humanos es frecuente. Sin embargo, la transmisión persona a persona es extremadamente inusual [142].

Tipo	Vía de transmisión	Fuente de infección	Población en Riesgo
<i>Contacto</i>	Piel erosionada, mucosa conjuntiva, mucosa nasal.	Tejidos animales o personas infectadas o sus productos como ganglios, sangre, orina, semen, secreciones vaginales, fetos abortados y placentas.	Trabajadores de la industria de la carne, veterinarios, peones de campo, personal de laboratorio o de servicios de salud.
<i>Ingestión</i>	Mucosa Digestiva	Alimentos no pasteurizados de origen animal como leche y sus derivados, y en menor medida carnes poco cocidas.	Población en general.
<i>Inhalación</i>	Mucosa nasal	Aerosoles en laboratorios con muestras contaminadas, vacunas vivas, aerosoles en lugares contaminados como establos, mataderos, salas de recepción de leche, lanas, etc.	Personal de laboratorio, trabajadores de la lana, personal de limpieza de los establos.
<i>Inoculación</i>	Parenteral o endovenosa por transfusiones	Vacunas vivas, material biológico contaminado	Personal de laboratorio, veterinarios.

Tabla 2. Vías de infección de *Brucella* en humanos.

## Sintomatología

El cuadro clínico y la evolución de la infección varían en función de la especie animal afectada. Tal es el caso de *B. abortus* que afecta primordialmente aparato genitourinario. Las bacterias de esta especie afectan principalmente ganado vacuno, teniendo preferencia por el endometrio grávido y la placenta fetal. La principal manifestación clínica de la infección aguda en los animales es el aborto durante el último tercio de la gestación o el nacimiento de animales prematuros poco viables. Se estima que entre el 40 y el 50% de las vacas afectadas tienen obstaculizadas su capacidad reproductora, como resultado de la enfermedad [143]. Las mamas y los ganglios linfáticos asociados también pueden infectarse y los microorganismos pueden aparecer en la leche [3]. La enfermedad es generalmente asintomática en las hembras no preñadas. En bovinos machos provoca alteraciones testiculares y una disminución de la fertilidad, acompañadas algunas veces por abscesos en testículos y epidídimo [143].

En humanos, el período de incubación puede variar de acuerdo a la virulencia de la especie infectiva, la vía de infección y la dosis infectante. En aquellas vías donde la carga

bacteriana infectiva que produce patología puede ser pequeña, como es el caso de la vía inhalatoria, el tiempo de desarrollo de la enfermedad será menor. Teniendo en cuenta los distintos factores que pueden influenciar el desarrollo de la enfermedad, es que el período de incubación puede variar entre 1 y 3 semanas, aunque la sintomatología puede aparecer hasta varios meses después. De acuerdo al tiempo de evolución de los síntomas, Young clasificó a la brucelosis arbitrariamente bajo 3 estadios: aguda, subaguda y crónica. Se considera fase aguda a los primeros 3 meses de la enfermedad, subaguda cuando el proceso infeccioso conlleva un período de entre 3 meses y 1 año, y crónica cuando la evolución del proceso infeccioso continua por más de un año [144].

La capacidad de *Brucella* a persistir y sobrevivir intracelular favorece a la cronicidad de la enfermedad. Es interesante notar que la virulencia y la tendencia a la cronicidad varían entre especies de *Brucella*, siendo *B. abortus* y *B. suis* las de mayor tendencia a la cronicidad. Por el contrario, *B. melitensis* produce las infecciones más agudas y severas, tanto en humanos como en animales [145].

La patología posee un índice de baja mortalidad, pero puede dejar secuelas incapacitantes de diversa magnitud. Aunque muchos pacientes pueden cursar la enfermedad de manera asintomática, la mayoría presenta sintomatología variable. El principal síntoma es la fiebre continua, intermitente o irregular, de duración variable de entre 10 y 30 días. La fiebre no tiene un patrón característico que pueda diferenciarla de la fiebre causada por alguna otra patología. Otros síntomas importantes son: cefalea, escalofríos, fatiga, diaforesis (sudoraciones nocturnas con olor característico), mialgias (dolores musculares), artralgia (dolores articulares), disuria (dificultad para orinar), pérdida de peso, anorexia y malestar generalizado [134].

Los signos clínicos que puede percibir el médico en el examen físico de los pacientes incluyen hepatomegalia (agrandamiento del hígado) y/o esplenomegalia (agrandamiento del bazo); leucopenia moderada y una relativa linfocitosis y leve anemia con trombocitopenia en el recuento celular en sangre [40, 134].

La brucelosis humana puede presentar complicaciones que involucran diversos órganos; lo que lleva a que **la enfermedad presente manifestaciones focalizadas como una de sus características clínicas más relevantes. Todas las posibles manifestaciones focalizadas comparten la característica distintiva de la enfermedad, que es la presencia de un proceso inflamatorio.** Esta particularidad, junto con la detección de bacterias en los tejidos inflamados, sugiere que *Brucella* estimula una robusta respuesta inflamatoria en los sitios en que se localiza [80].

La complicación osteoarticular es la presentación más frecuente de las formas focalizadas de la enfermedad, la cual puede afectar articulaciones periféricas, articulaciones

sacroilíacas o la columna vertebral. Los signos clínicos inflamatorios de esta manifestación son artritis, espondilitis (inflamación de las vértebras), sacroileítis u osteomielitis [146-148]. El segundo sitio de focalización más común es el sistema genitourinario, donde se puede presentar en el hombre como orquitis o epididimitis. La infección adquirida durante el embarazo constituye un riesgo de aborto espontáneo, mayoritariamente en el primer y segundo trimestre de embarazo, aunque la incidencia del mismo en humanos es muy baja [149]. En el hígado, la infección con *Brucella* induce lesiones hepáticas que pueden ser tanto granulomatosas como no granulomatosas. Histológicamente, los granulomas muestran necrosis central, un infiltrado de células polimórficas y fibrosis periférica [150].

*Brucella* también tiene la capacidad de afectar sistema nervioso (SN) y presentar signos inflamatorios como encefalitis y meningitis. Esta forma focalizada de la enfermedad se denomina neurobrucelosis. La pérdida del sueño, dolores de cabeza, confusión, sordera son algunos de los síntomas descritos en pacientes que padecían meningoencefalitis por infección con *Brucella* [134]. El examen del líquido cefalorraquídeo (LCR) en la meningitis ocasionada por *Brucella* generalmente revela un elevado contenido de proteínas y células inmunes como linfocitos y neutrófilos [151, 152]. Las biopsias quirúrgicas del cerebro o meninges y el examen postmórtem del tejido nervioso evidencian infiltrado linfocítico perivascular y formación de granulomas.

## NEUROBRUCELOSIS

La neurobrucelosis es la manifestación focalizada más dañina e invalidante de la brucelosis y, si bien es considerada una complicación rara, puede alcanzar una incidencia de hasta el 30%. Fue descrita por primera vez por Hughes en 1897 quien logró aislar a la bacteria a partir del tejido cerebral de un caso mortal [134].

La mayoría de los casos de neurobrucelosis están descritos en individuos infectados por *B. melitensis*, pero también se han descrito casos relacionados con la infección por *B. suis* y *B. abortus* [153, 154]. Se observó, incluso, un caso de meningoencefalitis, con aislamiento de la bacteria a partir de LCR, por inoculación accidental con la cepa vacunal *B. abortus* S19 [141]. Como mencionamos anteriormente, las especies marinas (*B. pinnipidialis* y *B. ceti*) tiene la capacidad de infectar sistema nervioso central (SNC), debido a que se identificaron ambas cepas en 2 pacientes que presentaban granulomas intracerebrales [6, 18]. Hasta el momento no queda claro si la mayor proporción de neurobrucelosis debido a *B. melitensis* se debe a características intrínsecas de la especie (un tropismo especial hacia el SN respecto de otras especies de *Brucella*) o a factores epidemiológicos como la forma de transmisión [155].

## Diagnóstico diferencial y tratamiento

La localización de *Brucella* en el SNC puede conducir a secuelas permanentes si el diagnóstico y el tratamiento es retardado [134], por lo tanto un diagnóstico precoz es fundamental en el desarrollo y evolución de la patología. El diagnóstico de la neurobrucelosis debe basarse en datos clínicos, epidemiológicos, de imágenes y de laboratorio. Más aún, en zonas endémicas, se debe sospechar de neurobrucelosis en cualquier paciente con un síndrome neurológico sin explicación [156]. Si bien la historia de una probable fuente de infección es fundamental para el diagnóstico de la brucelosis, algunos autores han reportado casos de neurobrucelosis en donde los datos epidemiológicos no fueron de ayuda [151].

El diagnóstico de certeza se realiza por el aislamiento de la bacteria a partir del LCR. Sin embargo, el aislamiento positivo es muy difícil (debido a limitaciones de la técnica) y solo es exitoso en un 20% de los casos [157]. Por lo tanto se utilizan diferentes técnicas [aglutinaciones, fijación del complemento, ELISA y ensayo de polarización fluorescente (FPA)] para detectar Acs específicos en el LCR. Estas pruebas, junto con la tomografía

computada (TC) y la resonancia magnética nuclear (RMN), son herramientas indispensables para el diagnóstico, el tratamiento y el seguimiento clínico de la neurobrucelosis [156].

La elección del tratamiento adecuado de la neurobrucelosis con antibióticos debe contemplar ciertas características como la capacidad de los mismos de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) y mantenerse a concentraciones adecuadas en el LCR, además de los requisitos generales de acción contra *Brucella*: que tengan penetración y actividad intracelular. Para el tratamiento de esta afección se utiliza, principalmente, la combinación de 3 drogas: doxicilina combinada con rifampicina y gentamicina [40]. Se desaconseja el uso de estreptomicina, dado que tiene baja capacidad de penetrar dentro del LCR y debido a su potencial neurotóxico [158]. El uso de corticoesteroides en etapas tempranas de la meningoencefalitis suele ser beneficioso [158]. El tratamiento es por lo general eficaz con los antibioticos disponibles, aunque de vez en cuando los pacientes desarrollan síntomas persistentes o recurrentes [155].

## Manifestaciones clínicas

*Brucella* tiene la capacidad de infectar tanto SNC como sistema nervioso periférico (SNP) y, en función de esto, la sintomatología que presenta el paciente puede ser diversa. La misma puede presentarse de forma aguda y en cualquier etapa posterior de la enfermedad, de formas sub aguda y crónica [159]. Se asocia principalmente el estado agudo de la neuropatología con la afección del SNC. En este caso, se observan signos inflamatorios como meningitis o meningoencefalitis acompañados de síntomas como dolor de cabeza, fotofobia, escalofríos, vómitos y pérdida de conciencia, entre otros. Por otro lado, la afección del SNP está vinculado a los estadios crónicos de la neuropatología y su sintomatología presenta debilitamiento de miembros inferior y decaimiento en la velocidad de la respuesta refleja [160]. La examinación clínica puede revelar rigidez nuchal hasta en el 50% de los pacientes [151].

La meningitis es el signo clínico más frecuente en neurobrucelosis presentándose en más del 90% los pacientes [161]. Su identificación requerirá del análisis de diversos factores clínicos: requiere de la presencia de un foco inflamatorio que involucre a las meninges, anormalidades en el LCR y evidencia directa o indirecta de *Brucella* en el LCR [151, 160, 162]. Comúnmente, la meningitis, puede estar asociada con encefalitis, meningoencefalitis, y/o mielitis. Tanto la encefalitis como la mielitis puede deberse a la acción directa de la bacteria en el tejido cerebral y en la médula espinal respectivamente [162]. También, la neurobrucelosis puede presentar granulomas brucelares [163] y abscesos intramedulares [164].

Todas las manifestaciones neurológicas (meningitis, encefalitis, mielitis, radiculitis y neuritis) pueden presentarse con o sin síntomas sistémicos. Hasta un 60% de los pacientes pueden presentar síntomas sistémicos, como artralgia, mialgia, astenia y sudoración [151]. Además, las manifestaciones neurológicas pueden estar asociadas con otras formas de focalización de la brucelosis [151].

Las neuropatías periféricas incluyen pérdida de visión por inflamación del nervio óptico [162], pérdida de audición [165] y ataxias [166]. El síndrome de Guillain-Barré es una polirradiculoneuropatía que se manifiesta como una enfermedad inflamatoria aguda desmielinizante y que resulta de la autorreactividad inmune a Acs del SNP. Puede ser consecuencia de enfermedades infecciosas (en el 60% de los casos), vacunas, cirugías, o enfermedades malignas, y ha sido asociada con brucelosis por algunos autores [167-169].

La neurobrucelosis también puede cursar con síntomas neuropsiquiátricos. Estos incluyen irritabilidad, psicosis, amnesia y depresión [144]. Además, pueden presentarse alteraciones del estado mental tales como obnubilación, deficiencias neurológicas, cuadros epilépticos, alteraciones intelectuales, convulsiones, pérdida del conocimiento y estados de coma.

Otras manifestaciones patológicas de la neurobrucelosis involucran trastornos cerebro-vasculares dentro de los cuales podemos mencionar la hemorragia subaracnoidea y la hipertensión intracraneal. También puede presentar ataques isquémicos transitorios que pueden resultar en infarto cerebral [170]. Si bien, las complicaciones vasculares solo pueden detectarse por angiografía, clínicamente pueden ser sospechadas por la obtención de LCR hemorrágico. La TC cerebral puede ser normal o evidenciar infarto cerebral [134, 162].

El examen del LCR en la meningitis provocada por *Brucella* generalmente revela alto contenido proteico (superior a 2 g/l), **pleocitosis**, la producción de Acs intratecales anti-*Brucella* y valores bajos de glucosa [159, 171].

## Inmunidad innata del SN

El SNC ha sido comúnmente considerado como un sistema de inmunoprivilegio protegido únicamente del microambiente externo por la BHE. Sin embargo, los últimos avances en el campo de las neurociencias han demostrado que el SN posee un sistema inmune innato especializado que lo convierte en un sistema activo inmunológicamente [172]. El desarrollo de las respuestas inmunes involucra diversos tipos celulares que se encuentran formando parte tanto del parénquima cerebral, de la periferia como de la interface entre ambos: la BHE. Paradójicamente, la activación de la inmunidad innata puede



causar un efecto nocivo para las neuronas, células de la glía y la microvasculatura cerebral [43, 172].

La BHE es una barrera funcional y estructural formada por células endoteliales vasculares, astrocitos y pericitos. Si bien, los astrocitos y los pericitos no conforman específicamente la BHE, condicionan el microambiente para que las células endoteliales adopten un fenotipo cerebral. De esta manera se definen las características distintivas de las células endoteliales cerebrales, como ser el desarrollo de uniones intercelulares especializadas, una alta resistencia eléctrica transendotelial y bajos niveles de transporte de sustancias [173]. Mientras que las células endoteliales interactúan por su lado luminal con moléculas bioactivas y células inmunes presentes en la circulación sanguíneas, también interaccionan en su lado abluminal con la lámina basal, conformada por proteínas de matriz extracelular (MEC), moléculas bioactivas (citoquinas, factores de crecimiento, etc.) y células que componen el parénquima cerebral [172].

Las células de la glía se encuentran en mayor proporción en el SNC y forman parte del parénquima cerebral. Dan soporte funcional, estructural y nutricional a las neuronas. Dentro de las células de la glía podemos distinguir tres poblaciones celulares: astrocitos, microglía y oligodendrocitos [174].

Los astrocitos son de origen neuroectodérmico y son esenciales para la homeostasis cerebral y las funciones neuronales [175, 176]. No se limitan simplemente a formar parte del soporte estructural de las neuronas, como se creía, sino que también están implicados en la modulación del microambiente neuronal; secretan factores de crecimiento neuronal; regulan la formación de la sinapsis; influyen en la transmisión sináptica, limitando la diseminación de los neurotransmisores [177, 178]; ocupan el lugar de las neuronas muertas (gliosis de reemplazo) [179] e incluso se ha demostrado que los astrocitos de hipocampo tendrían la capacidad de regular la neurogénesis estimulando células madres a adoptar perfiles neuronales [180]. Adicionalmente, los astrocitos se encuentran en íntima asociación con los vasos sanguíneos [181]. Por la influencia de la actividad neuronal, las terminaciones astrocitarias secretan mediadores que tienen como fin regular la contracción y dilatación de la musculatura lisa ejerciendo efectos sobre el diámetro de los vasos para regular el flujo sanguíneo. La ubicación de los astrocitos entorno al endotelio cerebral, promueve una estrecha relación con las células endoteliales, cumpliendo funciones tanto en el mantenimiento estructural como así también, en el correcto funcionamiento de la BHE [173, 182-184]. De esta manera, los astrocitos podrían influenciar la permeabilidad de la misma y el acceso de las células inmunes al parénquima del SNC [185, 186].

La microglía, perteneciente al linaje mieloide, es considerada la principal población responsable de la inmunidad del SNC, debido a que son los macrófagos residentes en este

sistema. Durante la enfermedad proliferan y son activamente fagocíticas, modificando su fenotipo y reactividad luego de una injuria o inflamación [187]. Si bien la microglía juega un rol crucial en la respuesta inmune innata del SNC [187, 188], los astrocitos también son capaces de contribuir al ambiente inflamatorio [175, 176, 189]. Por su parte, la microglía no participa en el mantenimiento del fenotipo de la BHE pero si en el mantenimiento de su homeostasis [190].

Tanto los astrocitos como la microglía son responsables de reconocer y eliminar microorganismos patógenos, y detectar señales de daño tisular ante una injuria. Son capaces de montar una respuesta rápida y efectiva para controlar la infección hasta que las células del sistema inmune adaptativo periférico, macrófagos y linfocitos, son reclutadas. Estas células residentes del SNC podrían regular el reclutamiento de células hemáticas infiltrantes y de esta manera también influenciar la translocación de microorganismos [191]. Ambas poblaciones tienen el potencial para desencadenar mecanismos con el fin de restituir la homeostasis del SNC [175, 176, 187].

Las tres poblaciones celulares, células endoteliales, astrocitos y microglía, actúan en conjunto para mantener el microambiente neuronal regulando el pasaje de iones, moléculas y células entre el interior y el exterior del tejido nervioso y protegiendo al mismo de cualquier microorganismo y toxina que esté circulando en sangre [192].

El rol de los receptores de la inmunidad innata (TLRs y NLRs) en el SNC ha sido estudiado principalmente en microglía pero se sabe que astrocitos, células endoteliales e incluso neuronas expresan estos mismos receptores [183, 193, 194]. La activación de tales receptores resulta en la inducción de vías específicas que tiene como fin promover la secreción de citoquinas específicas responsables de resolver la injuria [195]. Tanto los astrocitos como la microglía han demostrado responder a señales de infecciones bacterianas como LPS, peptidoglicano, o motivos no metilados CpG, tanto *in vivo* como *in vitro*, con incrementos en la secreción de citoquinas y quemoquinas inflamatorias, incluyendo IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  (CCL3), MIP-1 $\beta$  (CCL4), MCP-1 (CCL2) [43, 183, 184, 196-198].

Dentro de los mediadores inflamatorios, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  han sido las principales citoquinas relacionadas a la activación de la BHE [199]. TNF- $\alpha$ , por su parte, es la prototípica citoquina proinflamatoria. Es central en la defensa contra patógenos y en procesos inflamatorios pero bajo ciertas circunstancias, también desencadena muerte celular y degeneración tisular. Es por eso que la señalización de TNF- $\alpha$  dentro del SNC se encuentra entre la dicotomía de los efectos benéficos y los efectos deletéreos [18]. Está descrito como mediador responsable de la activación endotelial [200-202] como así también de la secreción de metaloproteasa de matriz (MMP)-9 y consecuentemente en el

daño tisular [203, 204]. IL-1 $\beta$  afecta principalmente astrocitos y células endoteliales e induce la expresión de quemoquinas, citoquinas, MMPs y moléculas de adhesión que ejercen efectos nocivos sobre la integridad de la BHE [205].

La estrecha interrelación entre las funciones neuronales y las funciones cerebrovasculares es fundamental para el correcto funcionamiento del SNC. Es por esto que las neuronas, las células gliales y las células endoteliales se encuentran en proximidad entre ellas conformando la unidad neurovascular (UNV) que conlleva a una visión integrada del SNC [206]. La importancia de la UNV en el contexto de la inmunidad innata depende de 2 aspectos: 1) los roles bien establecidos de la microglía y los astrocitos, y los recientemente descritos para las células endoteliales y pericitos en las respuestas inmunes innatas y 2) la producción de moléculas bioactivas luego de la inducción de la inmunidad innata en el SNC por estas células, dentro de las cuales, varias moléculas pueden modular las funciones de la BHE y como consecuencia modular las respuestas inmunológicas del SNC [172]. Los mediadores liberados por los astrocitos y la microglía luego del reconocimiento del patógeno disparan 2 eventos: 1) activan células vecinas y amplifican la respuesta local iniciando la respuesta inmune innata y 2) modifican la permeabilidad de la BHE y atraen células inmunes de la circulación dentro del tejido neural, dando comienzo a la respuesta inmune adaptativa.

## Patobiología de la neurobrucelosis

El compromiso neurológico generalmente ocurre como resultado de la diseminación sanguínea, pero puede ser también secundario a la extensión de un foco de osteítis del cráneo [207] o de las vértebras [134]. **Sea cual sea la fuente de diseminación de la bacteria, la invasión microbiana a través de la BHE es un prerequisite para acceder al SNC. Hasta el momento se desconoce cuál es el mecanismo utilizado por *Brucella* para acceder al SNC.** Dado que las bacterias del género *Brucella* han desarrollado varios mecanismos para sobrevivir y persistir dentro de diferentes células, especialmente dentro de macrófagos, es que el ingreso al SNC facilitado por fagocitos, mecanismo conocido como "Caballo de Troya", sería posible para la entrada de la bacteria al SNC [208, 209]. Además, debido a que la bacteria puede invadir células no fagocíticas [41, 208], otro posible mecanismo de entrada podría ser a través de la infección de las propias células endoteliales. De todas maneras, es claro que una vez que *Brucella* accede al SNC induce una respuesta patológica proinflamatoria.

**Si bien, los estudios dedicados a la patología de la neurobrucelosis son escasos, existen evidencias clínicas de alteraciones tisulares en SNC frente a la infección con *Brucella*. Ha sido propuesto que estas lesiones pueden ser producidas**

**por la presencia directa de la bacteria, por la acción de las citoquinas proinflamatorias y/o por el efecto dañino de la respuesta inmunopatológica** [162]. De todos modos, no se han descrito hasta el momento enzimas líticas, toxinas o proteasas producidas por *Brucella*, con lo cual el daño mediado por la acción directa de la bacteria es improbable.

Las alteraciones tisulares descritas incluyen diferentes grados de inflamación vascular, desde infiltrados crónicos (mononucleares plasmáticas y macrófagos) a agudos (PMN); inflamación meníngea difusa; edema cortical y granulomas no caseificantes. Si bien existen pocos reportes de casos clínicos en los que se han realizado biopsias cerebrales (por la complejidad del procedimiento y por razones éticas), podemos destacar el caso a partir del cual se logró aislar por primera vez *B. maris* [18]. En la biopsia se encontraron infiltrados linfocitarios perivasculares y granulomas junto con astrogliosis [18]. En otro caso, un paciente que había sido diagnosticado y tratado para brucelosis presentó, 4 meses después de finalizado el tratamiento, síntomas que referían al compromiso neurológico (pérdida de conocimiento y convulsiones) [210]. Los resultados histopatológicos mostraron un infiltrado compuesto por linfocitos y células plasmáticas, indicando un proceso inflamatorio crónico no granulomatoso en el tejido cerebral y en las meninges adyacentes.

Como quedó evidenciado, a pesar de no contar con muchos estudios patológicos, las descripciones microscópicas reportaron como signos constantes astrogliosis y microgliosis reactiva [18, 211]. La astrocitosis reactiva característicamente incluye un aumento en el número y tamaño de células que expresan el marcador específico de la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) (principal componente de los filamentos intermedios de los astrocitos) [151] y con frecuencia se supone que es el resultado de la proliferación astrogliar y migración de astrocitos que expresan GFAP desde las regiones vecinas. Este cambio fenotípico es complejo e implica la expresión de muchas moléculas nuevas no detectables en la astrogliá en reposo.

Hasta hace algunos años se desconocían los determinantes de patogénesis de esta forma de la brucelosis. Sin embargo, el aporte fundamental al conocimiento de la neuropatología reside en resultados de nuestro grupo de trabajo, donde se ha demostrado que la presencia directa de *B. abortus* en el cerebro de ratones induce una respuesta inflamatoria que lleva a la astrogliosis e infiltración de neutrófilos o PMN en el SNC [43]. Además, nuestro grupo ha demostrado, por primera vez, que *Brucella* tiene la capacidad de infectar y multiplicarse tanto dentro de la microglía como de los astrocitos [43]. Si bien estos resultados no son sorprendentes para la microglía, considerando la extensa literatura que apoya el tropismo de *Brucella* por los macrófagos [125, 212], la infección de astrocitos por *B. abortus* aportó nueva evidencia a la capacidad de la bacteria de infectar células no fagocíticas [43]. Como consecuencia de la infección con *B. abortus*, estas dos poblaciones

residentes del parénquima cerebral secretan citoquinas proinflamatorias (IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y quemoquinas (MCP-1 y KC). En este trabajo, se logró ahondar en los componentes estructurales de la bacteria que son responsables de las respuestas inmunológicas desencadenadas en las células gliales. Específicamente, las lipoproteínas de *B. abortus*, y no su LPS, fueron responsables de inducir un aumento en la proliferación celular y la muerte celular por apoptosis de los astrocitos. Más aun, se logró vincular a la citoquina TNF- $\alpha$  en la apoptosis de astrocitos observada en la patogénesis de esta manifestación focalizada [43].

El progreso en el conocimiento de la patobiología de la neurobrucelosis se ve obstaculizado por la falta de modelos animales apropiados en los cuales se reproduzcan las manifestaciones producidas por la patología en humanos. Sin embargo, recientemente la infección por exposición a aerosoles de *B. melitensis* de macacos permitió mimetizar algunas características patológicas observadas en humanos [213] e incluso corroborar la presencia de infiltrados leucocitarios y astrogliosis al evaluar la morfología celular de los astrocitos [214]. En conjunto estos resultados demostraron que la brucelosis inducida a través de aerosoles en los macacos aumenta dramáticamente la activación de los astrocitos y que TLR2 es uno de los receptores de la inmunidad innata implicados en esta activación [214].

La pleocitosis (presencia de leucocitos dentro del LCR) es considerada uno de los signos patognomónicos de la neurobrucelosis y conjuntamente con la producción de Acs intratecales específicos, sirven de diagnóstico diferencial de la manifestación focalizada en SNC [134]. La suma de estas evidencias clínicas a las observaciones histológicas que muestran la presencia de infiltrado leucocitario tanto en el parénquima cerebral de los pacientes como en el modelo murino desarrollado en nuestro laboratorio [43], son prueba de concepto de que **la infección del SNC con *Brucella sp* activa la BHE y modifica su integridad**. Una marcada elevación de las citoquinas IL-6, IL-8 y MCP-1 en pacientes con mielitis seguida a la infección cerebral con *B. melitensis* [215], que podrían promover el infiltrado leucocitario observado en los pacientes, fundamentan **la evidencia clínica de que la integridad de la BHE se encuentra alterada durante la neurobrucelosis**. Si bien, han sido bien descriptos los aspectos clínicos y diagnósticos que demuestran la existencia de una alteración de la BHE [134, 162, 216, 217], **los mecanismos patogénicos implicados en la activación de la BHE causada por *Brucella sp* no han sido investigados a nivel celular y molecular**.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

La hipótesis central que evaluamos en este trabajo es que **la inflamación del parénquima cerebral causada por *B. abortus* altera la integridad de la BHE**. Postulamos que *B. abortus*, mediante un mecanismo que proponemos dilucidar, atraviesa la BHE y al estimular la inmunidad innata del SNC modifica las características del endotelio vascular de la BHE, activando las células que lo componen y/o afectando la integridad del mismo.

Para corroborar esta hipótesis planteamos 2 objetivos:

1. **Dilucidar cuál es el mecanismo utilizado por *B. abortus* para acceder al SNC.**
2. **Evaluar cómo la respuesta inmune desencadenada frente a *B. abortus* por las células de la glía afecta la integridad de la BHE, evaluando que mediadores de la inflamación estarían involucrados.**

# MATERIALES Y MÉTODOS



### **Cultivo de bacterias**

*Brucella abortus* S2308, *B. abortus* S2308 expresando proteína verde fluorescente (*Brucella*-GFP)(Cedidas por el Dr. D. Comerci, UNSAM), *B. canis*, *B. melitensis* H38, *B. suis* 1330, *Escherichia coli* HB101 y *Citrobacter freundii* (Cedidas, estas dos últimas, por el Dr. Gabriel Gutkind de la Colección de Cultivos Microbianos de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires) fueron crecidas durante 18 hs en 10 ml de medio tripteína de soja en agitación constante de 150 rpm a 37°C. Las bacterias se centrifugaron por 15 min a 6.000xg a 4°C y fueron lavadas 2 veces en 10 ml de buffer fosfato salino (PBS). La concentración bacteriana, a partir de la cual se prepararon los inóculos en la concentración final deseada fue estimada comparando la densidad óptica del cultivo contra una curva estándar a 600 nm por espectofotometría. Posteriormente, se realizaron diluciones seriadas del inóculo con el fin de corroborar la concentración precisa por recuento de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de agar tripteína de soja.

Para obtener *B. abortus* muerta por calor (HKBA), luego de 5 lavados de 10 min con 10 ml PBS, las bacterias fueron calentadas a 70°C durante 20 min, alicuotadas y almacenadas a -70°C hasta su uso. La ausencia de viabilidad de *B. abortus* se corroboró mediante la ausencia de crecimiento bacteriano en placas de agar tripteína de soja. Todas las manipulaciones de las bacterias viables fueron realizadas en instalaciones con un nivel de bioseguridad 3 localizadas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA (INBIRS), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, gracias a un convenio de colaboración establecido con el Dr. H. Salomón.

### **Componentes bacterianos**

La proteína de membrana externa de *B. abortus* de 19 kDa lipídada (L-Omp19) así como la versión no lipídada (U-Omp19) fueron obtenidas de acuerdo a protocolos ya descriptos en nuestro laboratorio [80]. Ambas proteínas recombinantes contienen menos de 0,25 unidades de endotoxina por µg de proteína según se determinó por el ensayo de "Limulus Amebocyte" (Associates of Cape Cod Inc). El LPS de *B. abortus* S2308 y el LPS de *E. coli* O111 K58H2 fueron cedidos gentilmente por el Dr. I. Moriyón (Universidad de Navarra, Pamplona, España). La calidad y pureza de estas preparaciones se encuentran descriptas en la literatura [218]. El lipohexapéptido sintético, Pam<sub>3</sub>Cys (Tripalmitol-S-gliceril-Cys-Ser-Lys4-OH) fue obtenido de Boehringer Mannheim.

## **Animales**

Se utilizaron ratones de la cepa C57BL/6 deficientes (KO del inglés "*Knock out*") para la molécula adaptadora Mal/TIRAP, TLR2, TLR4, TLR6, la proteína adaptadora ASC (del inglés "*Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*"), caspasa-1 (Casp-1)/11, para el receptor de tipo NOD (NLR) conteniendo dominio pirin 3 (NLRP3) y para AIM2 (del inglés "*Absent in melanoma 2*") descritos previamente [92, 219-223] y provistos por el Dr. S. Oliveira de la Universidad Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brasil. Se utilizaron ratones salvajes (WT del inglés "*Wild type*") del mismo background genético provistos por la UFMG o por la Universidad Nacional de la Plata (UNLP), Argentina. Se utilizaron también ratones WT de la cepa BALB/C provistos por UNLP. Los animales fueron alojados en condiciones controladas de temperatura ( $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y luz artificial bajo ciclos de 12 hs. Los ratones fueron mantenidos en un ambiente libre de patógenos regulado por un gabinete de presión positiva y fueron provistos de comida estéril y agua *ad libitum*. Todos los procedimientos con animales fueron realizados de acuerdo a las reglas y estándares para el uso adecuado de animales de laboratorio y cuentan con la aprobación del comité de ética de la UFMG y de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Resolución número 357/2015).

## **Inyecciones estereotáxicas intracraneales**

Para las inyecciones esterotáxicas se utilizaron animales de entre 6 y 8 semanas de edad. Los animales fueron anestesiados con clorhidrato de ketamina (80 mg/kg de peso) y xilazina (8 mg/kg de peso) e inyectados en el cuerpo estriado del hemisferio cerebral derecho con 1  $\mu\text{l}$  de HKBA ( $1 \times 10^6$  bacterias). Las coordenadas del cuerpo estriado del hemisferio derecho fueron: Bregma +0,6 mm; lateral -1,7 mm y ventral -3,4 mm [224]. La inoculación se realizó con una jeringa Hamilton de 10  $\mu\text{l}$  a una velocidad (0,2  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) utilizando una bomba de infusión (Insight). La aguja fue mantenida por 5 min adicionales antes de retirarla para evitar el reflujo de la solución. Se inyectó el vehículo de la solución (Solución salina) como control en el hemisferio contralateral utilizando el mismo procedimiento.

## **Histología**

Los animales fueron anestesiados y sacrificados luego de 24 hs de las cirugías esterotáxicas. Los ratones fueron perfundidos transcárdicamente con una solución de heparina seguida de paraformaldehído (PFA) 4% frío 0,1 M en PBS con ayuda de una

bomba peristáltica (4 ml/min). Se realizó la incisión de la aorta para permitir la circulación de la solución por todos los tejidos. Luego de completar las perfusiones, los animales fueron decapitados con el fin de extraer los cerebros. Los mismos fueron fijados durante toda la noche en PFA 4% y posteriormente transferidos a una solución de sacarosa al 30% en PBS hasta su completa saturación. Para preservar el tejido, los cerebros fueron congelados en isopentano y luego seccionados en cortes seriados de 30  $\mu$ m a lo largo de todo el cuerpo estriado en un plano coronal en un crióstato para la tinción con violeta de cresilo como ya había sido descrito por nuestro grupo [43]. Los infiltrados neutrofílicos fueron determinados y expresados como un "Score" considerando la cantidad de neutrófilos presentes en una sección del cuerpo estriado y el número de secciones de cuerpo estriado que presentaron infiltrados.

### **Cultivo celular**

#### *Células endoteliales de microvasculatura cerebral (HBMEC)*

Las células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC, del inglés "*Human brain microvascular endothelial cells*") (Cedida gentilmente por el Dr. Kwang Sik Kim, División de enfermedades infecciosas pediátricas del Hospital Johns Hopkins, Baltimore) fueron aisladas a partir de biopsias cerebrales de niños con epilepsia [225]. Estas células resultaron positivas para el factor VIII-Rag, anhidrasa carbónica IV (CAIV) y aglutinina I *Ulex europaeus*, como marcadores específicos de células endoteliales humanas. Además, son capaces de captar lipoproteína de baja densidad acetilada (AcLDL) y expresar  $\gamma$ -glutamyl transpeptidasa (GGTP) demostrando por lo tanto propiedades fenotípicas de células endoteliales cerebrales humanas [225]. Posteriormente, las HBMEC fueron inmortalizadas por transfección con un plásmido conteniendo el antígeno largo T del virus de simio (SV40-LT) manteniendo subsecuentemente las características morfológicas y funcionales por al menos 30 pasajes [226]. Se caracterizan por ser células polarizadas que exhiben resistencia eléctrica transendotelial de al menos 100 ohms/cm<sup>2</sup> [227]. Las HBMEC fueron cultivadas en medio estándar compuesto por RPMI 1640 suplementado con 25 mM de Buffer Hepes, 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado por calor (Life Technologies), 10% de NuSerum IV (Becton Dickinson), 2 mM de L-glutamina, 1% de aminoácidos no esenciales MEM (Life Technologies), 1 mM de piruvato de sodio, solución de vitaminas MEM (Life Technologies), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de streptomycin e incubadas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Las HBMEC fueron utilizadas, para los diferentes experimentos, a una densidad de 200.000 células/ml.

### *Cultivo primario de astrocitos y microglía*

Se realizaron cultivos mixtos de células del SNC a partir de cerebros de crías de ratones de entre 1 y 3 días de edad según procedimientos ya establecidos en el laboratorio [43]. Los mismos fueron cultivados en medio estándar compuesto por DMEM con alta concentración de glucosa, 10% de SFB inactivado por calor (Natocor), 2 mM de L-glutamina, 1 mM de piruvato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de streptomicina e incubados a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> entre 15 y 20 días [43]. Los cultivos primarios de astrocitos y microglía fueron establecidos a partir de los cultivos mixtos por agitación diferencial y tripsinización [43] y utilizados a una densidad de 900.000 células/ml. La pureza fue mayor al 95% en cada población celular.

### *Obtención de monocitos y neutrófilos*

Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) por centrifugación en un gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) de sangre humana colectada de donantes voluntarios adultos sanos del Servicio de Hemoterapia del Hospital de Clínicas. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los pacientes y los procedimientos de las muestras se encontraron bajo el aval del comité de ética del INIGEM. Los monocitos fueron posteriormente purificados a partir de la centrifugación de los PBMCs en un gradiente de Percoll (GE Healthcare) y resuspendidos en medio estándar (2,5x10<sup>6</sup> células/ml) considerando protocolos ya realizados en el laboratorio [122]. La pureza de los monocitos aislados, positivos para el marcador CD14<sup>+</sup>, fue mayor al 80% según se determinó por citometría de flujo.

Los neutrófilos fueron purificados a partir de sangre periférica de donantes sanos por centrifugación en gradiente de Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare), seguido de una sedimentación con Dextran al 6% y una lisis hipotónica para eliminar los eritrocitos contaminantes como ya fue descrito [66]. La pureza final de la preparación de neutrófilos fue mayor al 90% de acuerdo a sus características morfológicas analizada por citometría de flujo.

### ***Infección***

Los distintos tipos celulares fueron cultivados en el medio específico de cada tipo celular con todos los suplementos nutritivos pero sin el agregado de antibiótico ni SFB. Se realizó la infección a las multiplicidades de infección (MOIs, UFC bacterianas/célula) indicadas en cada figura durante 2 hs (para células no fagocíticas, HBMEC y astrocitos) o 1

h (para células fagocíticas profesionales, microglía y monocitos). Transcurrido el tiempo de incubación las células fueron lavadas con PBS, con el fin de remover las bacterias no internalizadas, y mantenidas o no en presencia de 100 µg/ml de gentamicina y 50 µg/ml de estreptomicina. Posteriormente, se realizó el procesamiento de los cultivos: **1)** lisados celulares con 0,1% (V/V) de tritón X-100 (Sigma-Aldrich) en H<sub>2</sub>O para recuento de UFC/ml; **2)** recolección de sobrenadantes de infección de 24 hs que, luego de ser filtrados en un filtro de nitrocelulosa de 0,22 µm de poro, son utilizados para estimulación otro tipo celular; **3)** recolección de sobrenadantes para la medición de mediadores solubles por zimografía/ELISA (citoquinas, quemoquinas y MMP) y/o **4)** la utilización de las células para protocolos de citometría/microscopía.

### *Inhibidores de la internalización bacteriana*

Se utilizaron los siguientes inhibidores: citocalasina D, colchicina, ciclohexamida y monensina (Sigma-Aldrich) en las concentraciones indicadas. Los mismos fueron adicionados previamente al procedimiento de infección (1 h antes a 37°C) y mantenidos durante todo el período de infección. Luego del cultivo se realizaron lisados celulares de las HBMEC con 0,1% (V/V) de tritón X-100 (Sigma) en H<sub>2</sub>O para cuantificar las UFC/ml. Debido a que la citocalasina D se solubilizó en DMSO y la Monensina en Etanol, las HBMEC fueron pre-tratadas con ambos vehículos de disolución. Ninguno de los inhibidores a las concentraciones usadas tuvo efecto sobre la viabilidad de las células HBMEC como se determinó por ensayos de exclusión con azul de tripán.

### ***Estimulación celular***

En el segundo capítulo las HBMEC fueron estimuladas con sobrenadantes de infección de 24 hs de células gliales (astrocitos y microglía) provenientes de ratones WT a las diluciones indicadas. En los experimentos empleando sobrenadantes de infección de células gliales provenientes de ratones KO, se utilizó una dilución 1/5. Para aquellos experimentos en los cuales los sobrenadantes fueron tratados o no con Ac neutralizantes (ver neutralización de citoquinas) la dilución utilizada fue 1/5. La citoquina recombinante TNF-α (5 ng/ml) (Millipore) y la citoquina recombinante de IL- 1β (500 pg/ml) (Millipore) fueron utilizadas como control.

En el tercer capítulo, los cultivos de astrocitos fueron estimulados durante 48 hs con LPS de *B. abortus* (1.000 ng/ml), HKBA (entre 1x10<sup>6</sup> y 1x10<sup>9</sup> bacterias/ml), U-Omp19 (1.000

ng/ml), L-Omp19 (entre 10 y 1.000 ng/ml), Pam<sub>3</sub>Cys (25 ng/ml), forbol miristato acetato (PMA) (50 ng/ml) (Sigma-Aldrich) y TNF- $\alpha$  (5 ng/ml).

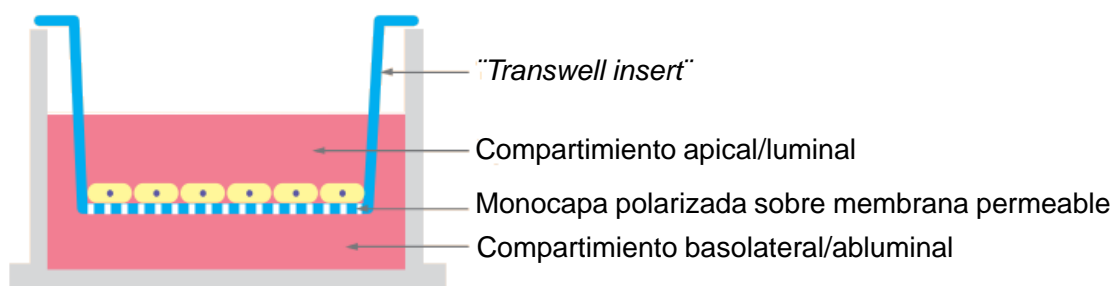
Luego de transcurrido el tiempo de estimulación se realizaron los siguientes procedimientos: **1)** recolección de sobrenadantes para la medición de mediadores solubles por zimografía/ELISA (citoquinas, quemoquinas y MMP) y/o **2)** la utilización de las células para protocolos de citometría.

### **Neutralización de citoquinas**

Los experimentos de neutralización fueron realizados utilizando 20  $\mu$ g/ml de Ac neutralizante anti-TNF- $\alpha$  (Clon MP6-XT3, BD Pharmigen) o 30  $\mu$ g/ml de Ac neutralizante anti-IL-1 $\beta$  (Clon B122, eBioscience) y sus controles de isotipo correspondientes utilizados en las mismas concentraciones. En el capítulo II, los sobrenadantes de cultivos de células gliales infectadas con *B. abortus* fueron pre-incubados con los Ac neutralizantes o sus respectivos controles de isotipo durante 1 h a 37°C previamente a ser utilizados para estimular a las HBMEC. En el Capítulo III, el Ac neutralizante anti-TNF- $\alpha$  fue adicionado a los cultivos primarios de astrocitos previamente a ser infectados con *B. abortus*.

### **Modelo in vitro de BHE**

Se estableció una monocapa polarizada de HBMEC a partir de  $2 \times 10^4$  células en un sistema de "transwell insert" (Corning Costar) de 6,5 mm de diámetro de insert y un tamaño de poro de 0,3  $\mu$ m previamente tratado durante 20 min con una solución de colágeno (BD Bioscience) en ácido acético (50 mg/ml en solución 1% de ácido acético) y neutralizado en campana de amonio. Luego de 24 hs en el medio estándar de las HBMEC, el mismo fue reemplazado por el mismo medio pero sin el agregado del suplemento de NuSerum y mantenido durante 4 días adicionales en cultivo, momento en el cual se alcanzó la confluencia celular y se realizaron los experimentos correspondientes. Como se muestra en la figura, este sistema de filtros permeables permite establecer un compartimiento apical/luminal ubicado por encima del "insert" y un compartimiento basolateral/abluminal por debajo del "insert".



### *Ensayos de trans migración bacteriana*

Se adicionó en el compartimiento apical de las monocapas de HBMEC *B. abortus*, *Escherichia coli* HB101 o *Citrobacter freundii* ( $1 \times 10^8$  bacterias) y, a los tiempos indicados, se realizó en el compartimiento basolateral el recuento de UFC/ml de las bacterias. Alternativamente, se adicionaron en el compartimiento apical  $1 \times 10^5$  monocitos infectados o no con *Brucella* a MOI 100. Luego de un período de incubación de 4 hs, a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub>, se cuantificó la cantidad de monocitos que trasmigraron y las UFC a partir de los lisados celulares. Conjuntamente se adicionó la enzima peroxidasa (HRP de inglés "horseradish peroxidase") (1/500) al compartimiento apical y la incapacidad de la misma para difundir libremente entre el compartimiento apical y basolateral fue utilizado como un control de integridad de la monocapa.

### *Ensayos de trans migración de monocitos y neutrófilos*

Monocapas de HBMEC fueron incubadas con sobrenadantes de cultivo de astrocitos WT o KO infectados o no con *B. abortus* 24 hs antes del agregado de monocitos o neutrófilos ( $1 \times 10^5$  células) al compartimiento superior. En los experimentos indicados, el sobrenadante de infección utilizado para estimular la monocapa fue previamente incubado con un Ac neutralizante anti-IL-1 $\beta$  o su control de isotipo como ya fue descrito en neutralización de citoquinas. La citoquina recombinante de IL-1 $\beta$  (500 pg/ml) fue utilizada como control. Alternativamente, las monocapas de HBMEC fueron infectadas con *B. abortus* (MOI 100) previamente a la adición de monocitos o neutrófilos en el compartimiento apical o luminal. Las placas fueron incubadas durante 3 hs a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> para posteriormente contar, en el compartimiento basolateral o abluminal, el número de células que transmigraron a través de la monocapa de HBMEC.

## ***Determinación de la concentración de mediadores solubles por ELISA***

### *Determinación de citoquinas y quemoquinas*

La secreción de las citoquinas humanas (h) TNF- $\alpha$ , hIL-1 $\beta$  e hIL-6 y las quemoquinas hIL-8 y hMCP-1 fue medida en los sobrenadantes de cultivo de las HBMEC infectadas con *B. abortus* o estimuladas con sobrenadantes de infección de células gliales (astrocitos y microglía) infectadas con *B. abortus*. La secreción de las citoquinas murinas (m) TNF- $\alpha$  y mIL-1 $\beta$  fue medido en el sobrenadante de infección de las células gliales infectadas con *B.*

*abortus* que fueron utilizadas para estimular las HBMEC. En el capítulo III también se evaluó la secreción de mTNF- $\alpha$  en cultivo de astrocitos estimulados con HKBA o componentes bacterianos con tratamientos de inhibidores farmacológicos de las MAPKs. La cuantificación de las citoquinas y quemoquinas se realizó por la técnica de ELISA sándwich, usando Acs monoclonales específicos según instrucciones del fabricante (BD Pharmigen).

#### *Determinación de los niveles de MMP-9*

La secreción de MMP-9 en el sobrenadante de cultivo de astrocitos, evaluados a lo largo del capítulo III, fue cuantificada mediante ELISA de Sándwich utilizando Acs monoclonales según instrucciones del fabricante (R&D Systems).

#### ***Determinación de la actividad gelatinasa por Zimografía***

La actividad gelatinasa fue evaluada por el método de Hibbs [228], el cuál fue estandarizado por otros [229-231]. Veinte  $\mu$ l de sobrenadante de infección de astrocitos, 20  $\mu$ l de sobrenadante de cultivo proveniente de la estimulación de astrocitos con los diferentes componentes bacterianos o 20  $\mu$ l de LCR de pacientes con neurobrucelosis, tratados o no con Ac neutralizantes o con inhibidores de las MAPK, se mezclaron con 5  $\mu$ l de buffer de siembra 5X [0,25 M Tris (pH 6,8), 50% de glicerol, 5% de dodecil sulfato de sodio (SDS), y azul de bromofenol]. Los diferentes sobrenadantes con buffer de siembra fueron sembrados en un gel de SDS-PAGE al 10% conteniendo 1 mg/ml de gelatina (Sigma-Aldrich). Luego de la electroforesis, los geles fueron lavados con 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) - 2,5% de Tritón X-100 (buffer A) por 30 min y luego con el mismo buffer A pero con el agregado de 5 mM de  $\text{CaCl}_2$  y 1  $\mu$ M de  $\text{ZnCl}_2$  por otros 30 min. Posteriormente fueron mantenidos durante 48 hs a 37°C en buffer A con el agregado de 10 mM  $\text{CaCl}_2$  y 200 mM NaCl. Este paso de desnaturalización/renaturalización promueve la actividad de MMP sin el clivaje proteolítico de la pro-MMPs. La actividad gelatinolítica fue visualizada mediante la tinción de los geles con azul de Coomassie. Las bandas sin teñir indicaron la presencia de actividad gelatinolítica, y su posición determinó el peso molecular de las enzimas involucradas. La identidad de la MMP candidata fue confirmada mediante un ensayo de ELISA mencionado anteriormente.

#### ***Determinación de la actividad gelatinolítica neta en condiciones nativas***

La actividad gelatinolítica en condiciones nativas de los sobrenadantes de cultivo de astrocitos, evaluada a lo largo del capítulo III, fue medida mediante el kit EnzChek



gelatinasa/colagenasa (Invitrogen) según las instrucciones del fabricante. El kit contiene gelatina DQ, una gelatina conjugada a altas concentraciones de fluoresceína impidiendo la capacidad de emitir señales de fluorescencia. Cuando el sustrato es digerido por gelatinasas o colagenasas da como resultado la aparición de péptidos fluorescentes, siendo el incremento de la fluorescencia proporcional a la actividad proteolítica. La colagenasa purificada de *Clostridium histolyticum* que provee el kit, sirvió como una enzima control. La intensidad de la fluorescencia fue medida en un lector de fluorescencia Victor3® (Perkin-Elmer).

### ***Determinación de la expresión de la molécula de adhesión CD54 por citometría de flujo***

Las HBMEC infectadas con *B. abortus* o estimuladas con sobrenadante de cultivo de células gliales infectadas con la bacteria fueron lavadas con PBS e incubadas con un Ac anti-CD54 (ICAM-1) humano conjugado a ficoeritrina (PE) (Clon HA58) o su control de isotipo (BD Pharmigen). Las células marcadas fueron analizadas en un citómetro de flujo FACSCalibur (BD Bioscience) y los datos fueron procesados utilizando el programa CellQuest (BD Bioscience). Los resultados fueron expresados como intensidad de fluorescencia media (IFM) según se indica en cada experimento.

### ***Microscopía***

Para el análisis de la localización subcelular de *B. abortus*, las HBMEC ( $10^5$  células sembradas en cubreobjetos circulares de 12 mm de diámetro) fueron infectadas con *Brucella*-GFP a MOI 100 por 24 hs. Luego las células fueron fijadas con PFA 4% durante 1 h, permeabilizadas/bloqueadas con buffer saponina 0,1% en PBS con SFB durante 30 min. Posteriormente, los compartimientos subcelulares fueron detectados mediante Acs primarios específicos para RE anti-calnexina (Clon 37) (1/20) y endosomas tardíos/lisosomas anti-human CD107b (LAMP-2) (Clon H4B4) (1/50) (BD Pharmingen) seguidos de un Ac secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-546 (rojo) (1/300 y 1/200 respectivamente) (Life Technologies).

Para los experimentos de infección de células adyacentes, los astrocitos fueron sembrados a una densidad de  $5 \times 10^4$  células/cubreobjetos y luego co-cultivados durante 24 y 48 hs con  $2 \times 10^4$  monocitos infectados con *Brucella*-GFP a MOI 100. Los co-cultivos fueron fijados con PFA 4%, permeabilizados con 0.125% Tritón X-100 y bloqueados con 5% de SFB. Posteriormente, los astrocitos fueron detectados utilizando un Ac anti-GFAP (marcador

específico para astrocitos) revelado con un Ac secundario anti-IgG de ratón conjugado a Alexa-546 (Rojo) para determinar en qué tipo celular se encuentra presente *Brucella*-GFP.

En ambos experimentos, los cubreobjetos fueron incubados con una solución de TOPRO-3 ® (Invitrogen) (1/1000) durante 5 min con el fin de visualizar del núcleo celular y luego montados con PolyMount (Polysciences) sobre un portaobjetos. Para la adquisición se utilizó un microscopio confocal FV-1000 con un objetivo de inmersión en aceite de Plano Apocromático 60X NA1.42 (Olympus) y para el análisis el programa Image J (Fiji).

### ***Vías de señalización de las MAPK***

#### ***Determinación de la activación de las vías p38, Erk1/2 y Jnk1/2 por Western Blot***

Se realizaron lisados celulares de cultivos primarios de  $1,5 \times 10^6$  astrocitos por acción de buffer de lisis a 4°C conteniendo 1% de Tritón x-100 en TBS (150 mM de NaCl, 25 mM Tris-HCl) pH 7,4 con el agregado de cocteles inhibitorios de proteasas y fosfatasas (Sigma-Aldrich) estimulados con HKBA o los componentes bacterianos L-Omp19 y U-Omp-19. Los lisados celulares fueron incubados en hielo/congelados durante 10 min y luego centrifugados a 13.000Xg durante 15 min a 4°C. La concentración de proteínas totales en los sobrenadantes de los lisados celulares, luego de la centrifugación, fue determinada por el kit de ensayo de proteínas de ácido bicinonínico (BCA) (Thermo Scientific Pierce) usando como referencia una curva de proteínas estándar realizada con albumina sérica bovina. Se sembraron las mismas cantidades proteicas para cada lisado celular (30µg) en el gel SDS-PAGE 12%. Luego de la separación electroforética las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-ECL (Amersham GE Healthcare) durante 1 h a 300 mA. Las membranas fueron bloqueadas durante 1 h con 0,1% Tween-20 en TBS y posteriormente incubadas con los Ac primarios anti-Erk1/2 y anti-p38 (total o fosforilados) (Santa Cruz Biotechnology) (1/1.000) o Ac primario anti-Jnk1/2 (total o fosforilado) (Cell signaling Technology) (1/1.000) durante una noche a 4°C. Luego de lavar las membranas con TBS 0,05% Tween-20, las mismas fueron incubadas con un Ac secundario conjugado a peroxidasa (Santa Cruz Biotechnology) (1/1.000) durante 1 h. La inmunoreactividad fue detectada utilizando el reactivo ECL Western Blotting Substrate (Amersham GE Healthcare). Las bandas proteicas fueron reveladas en placas radiográficas Kodak Medical X-Ray General purpose Film. Se realizó el análisis densitométrico de las bandas utilizando el programa Image J (Fiji).

### ***Funcionalidad de las vías de señalización de las MAPK***

Se adicionaron inhibidores farmacológicos específicos para cada una de las vías de las MAPK: SB203580 inhibidor de p38, PD98059 inhibidor de Erk1/2 y SP600125 inhibidor de Jnk1/2 o el vehículo de disolución, dimetil sulfóxido (DMSO) 2 hs antes de la infección celular o de la estimulación con HKBA o con los componentes bacterianos y mantenidos durante todo el experimento. SB203580, PD98059 y SP600125 (Calbiochem) fueron usados en las siguientes concentración finales 6  $\mu$ M, 50  $\mu$ M y 10  $\mu$ M respectivamente, considerando reportes previos [232]. La viabilidad celular, luego de la incubación con los inhibidores, fue analizada por exclusión del colorante vital azul de tripán siendo mayor al 90% en todos los casos. Para considerar cualquier efecto del DMSO sobre la viabilidad celular, cultivos celulares no tratados con los inhibidores fueron tratados con la concentración final más elevada de DMSO utilizada en los estudios (0,01%) y los resultados de los parámetros analizados fueron comparados con los cultivos celulares no expuestos a ningún tratamiento.

### ***Muestras de pacientes***

Las muestras de LCR y suero fueron obtenidas de: a) pacientes con sospecha de enfermedad de Alzheimer que fueron utilizados como pacientes controles sin infección, b) pacientes con neurobrucelosis, presentando signos y síntomas de implicancia neurológica, aislamiento de *Brucella* spp de LCR y detección de Acs anti-*Brucella* en LCR detectados por aglutinación o test de Coombs, c) pacientes con brucelosis sin implicancia neurológica debido a que presentaron sintomatología de brucelosis y fueron positivos serológicamente para *Brucella*, presentaron dolores de cabeza justificando la extracción de LCR pero los parámetros físico-químicos de las muestras de LCR fueron normales y no presentaron Ac anti-*Brucella*, d) pacientes cursando con un proceso de meningitis pero causado por otro agente infeccioso diferente a *Brucella* spp (*Staphylococcus aureus* y *Streptococcus* spp.). Los Ac contra proteínas citoplasmáticas y LPS de *Brucella* fueron detectados en LCR y muestras de suero como fue descripto [233]. La secreción de MMP-9 en las muestras de LCR fue detectado por la técnica de zimografía descripta anteriormente. Se obtuvo el consentimiento por escrito de todos los pacientes y los procedimientos de las muestras se encontraron bajo el aval del comité de ética del IDEHU.

***Análisis estadístico***

El análisis estadístico empleado fue One-Way ANOVA seguido del test Bonferroni utilizando el programa GraphPad Prims 5.0. Los datos son representados como media estadística  $\pm$  media de error estándar (SEM).

# RESULTADOS

## CAPITULO I

*‘B. abortus atraviesa la BHE dentro de monocitos infectados mediante el mecanismo Caballo de Troya’*

## Introducción

Un evento clave en la patogénesis de las infecciones del SNC es cómo los microorganismos interaccionan con la BHE y la atraviesan para acceder al parénquima cerebral. Por lo general, la invasión bacteriana del SNC ocurre a través de la diseminación sanguínea en etapas tempranas de la infección, causando meningitis. En el caso de *E. coli* K1, algunos autores demuestran que si bien es necesario un alto grado de bacteriemia en sangre para afectar SNC, ésta no es suficiente para generar meningitis y que la adhesión e invasión de la bacteria a las células endoteliales de la microvasculatura cerebral es un paso fundamental en la patología [191].

Existen tres mecanismos a través de los cuales los patógenos pueden atravesar la BHE: el mecanismo denominado paracelular en el cual el microorganismo pasa entre las uniones intercelulares de las células endoteliales, el mecanismo transcelular en el cual el microorganismo transmigra a través de las células endoteliales sin evidencia de disrupción de uniones intercelulares y, por último, el mecanismo denominado "Caballo de Troya" en el cual el ingreso del patógeno se ve facilitado por un leucocito infectado [191, 208]. Las bacterias extracelulares utilizan principalmente los mecanismos paracelular y transcelular. En contraposición, los microorganismos intracelulares típicamente no utilizan el mecanismo paracelular y la estrategia transcelular está modificada por el hecho que la replicación bacteriana a menudo toma lugar dentro de las células endoteliales [208].

Dado que bacterias del género *Brucella* han desarrollado varios mecanismos para sobrevivir y persistir dentro de las células, especialmente dentro de macrófagos, se ha sugerido que la infección del SNC facilitada por fagocitos, "Caballo de Troya", es un mecanismo posible para la entrada de la bacteria [208, 209]. Además, hemos mencionado que la bacteria puede infectar células no fagocíticas por lo que otro posible mecanismo de entrada sería la invasión transcelular a través de las células endoteliales [41, 208]. **Sin embargo, se desconoce hasta el momento cual es el mecanismo utilizado por *Brucella* para acceder al SNC.**

La infección de las células de la microvasculatura cerebral por microorganismos puede inducir la disfunción de la BHE, afectar la secreción de citoquinas y quemoquinas y modificar la expresión de moléculas de adhesión, induciendo citotoxicidad y apoptosis en las células endoteliales de la microvasculatura cerebral y generando un aumento en la permeabilidad de la BHE, con la consecuente pleocitosis y encefalopatía [191]. Por tal motivo el objetivo del presente capítulo se centra en analizar las interacción de *B. abortus* con las células endoteliales de la microvasculatura cerebral, y en evaluar la capacidad de la

bacteria para infectar y activar células de la BHE utilizando como modelo una línea de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC, del inglés "*Human brain microvascular endothelial cells*"). Por otro lado, se estudiará el mecanismo utilizado por la bacteria para translocar a través de dichas células.

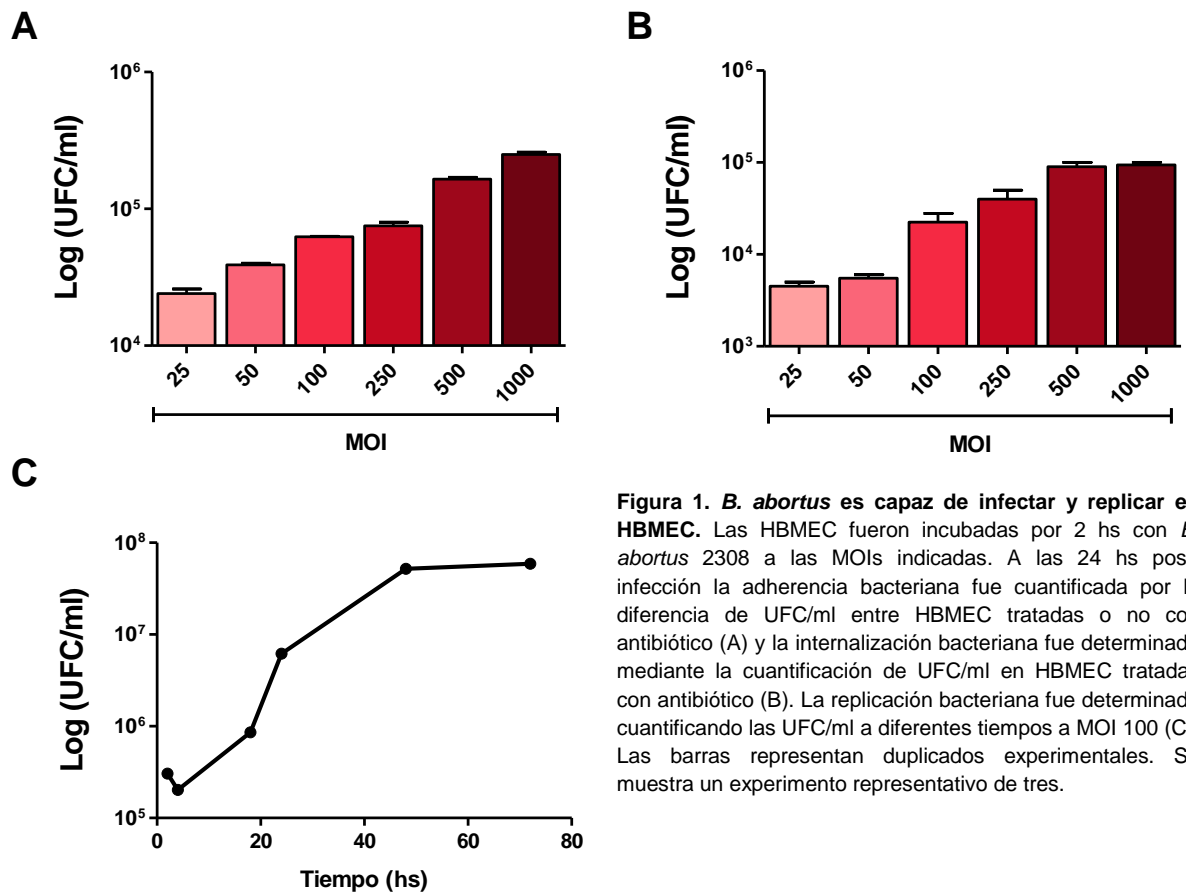


## Resultados

### ***B. abortus* es capaz de infectar y replicar en HBMEC.**

Resultados previos, publicados por integrantes de nuestro grupo sobre patología vascular inducida por *B. abortus*, indican que la bacteria es capaz de infectar y replicarse en células endoteliales humanas de vena de cordón umbilical (HUVECs) y en una línea de células endoteliales de microvasculatura (HMEC-1), empleadas como modelo de células endoteliales de vasculatura periférica [48]. Decidimos, por lo tanto, evaluar si *B. abortus* tenía la capacidad de interactuar con una línea de células endoteliales de microvasculatura cerebral humana (HBMEC). Las HBMEC presentan todas las propiedades inherentes a células endoteliales cerebrales [225], manteniendo sus características morfológicas y funcionales por al menos 30 pasajes [226] (Ver descripción de la línea celular en MyM).

En primer lugar decidimos evaluar la adhesión bacteriana a las HBMEC. Para ello, incubamos las HBMEC con diferentes multiplicidades de infección (MOIs) durante 2 horas. Luego de lavarlas y algunas de ellas fueron tratadas con antibiótico durante media hora con el fin de eliminar las bacterias que no fueron internalizadas (tiempo al cual el antibiótico logra eliminar a las bacterias extracelulares) y otras se dejaron en medio completo sin antibiótico para determinar el número total de bacterias (adheridas e internalizadas). Posteriormente se sembraron en TSB los lisados celulares para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC). El número de bacterias adheridas extracelularmente fue calculado por diferencia entre el número de bacterias internalizadas (UFC de células tratadas con antibiótico) y la cantidad total de bacterias obtenidas en ausencia de antibióticos (cuantificación de UFC totales). Se observó que *B. abortus* se adhiere a las HBMEC y que la adherencia bacteriana fue dependiente de la MOI utilizada para infectar (Figura 1A). Además, la cuantificación de UFC de los lisados celulares en presencia de antibiótico demostró que *B. abortus* es capaz de internalizarse dentro de las HBMEC y que el número de bacterias intracelulares es también directamente proporcional a la MOI utilizada para infectar (Figura 1B). Más aun, la bacteria fue capaz de multiplicarse eficientemente dentro de las HBMEC cuando se evaluó la replicación bacteriana a diferentes tiempos a una MOI determinada (Figura 1C). Estos resultados demuestran que *B. abortus* tiene la capacidad de adherirse, infectar y replicar en HBMEC.

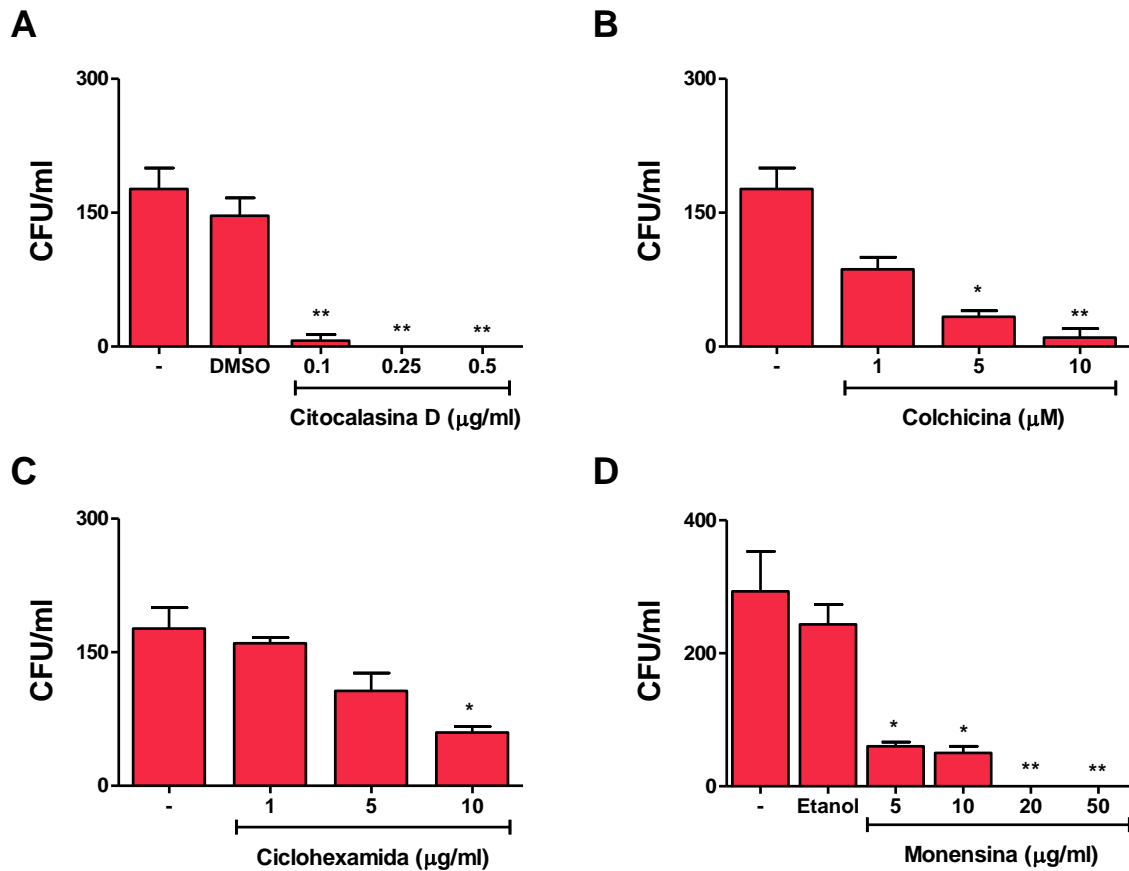


**Figura 1. *B. abortus* es capaz de infectar y replicar en HBMEC.** Las HBMEC fueron incubadas por 2 hs con *B. abortus* 2308 a las MOIs indicadas. A las 24 hs post-infección la adherencia bacteriana fue cuantificada por la diferencia de UFC/ml entre HBMEC tratadas o no con antibiótico (A) y la internalización bacteriana fue determinada mediante la cuantificación de UFC/ml en HBMEC tratadas con antibiótico (B). La replicación bacteriana fue determinada cuantificando las UFC/ml a diferentes tiempos a MOI 100 (C). Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres.

### ***B. abortus* es internalizada activamente por las HBMEC.**

A continuación decidimos determinar cuál era el rol que desempeñaban los componentes celulares de las células HBMEC en el proceso de internalización de *B. abortus* utilizando inhibidores eucarióticos. Para llevar a cabo este objetivo, se analizó el rol que desempeña el citoesqueleto de actina utilizando citocalasina D, un agente que causa la despolimerización de los microfilamentos en células eucariotas. Para establecer el rol de los microtúbulos se utilizó colchicina como un agente desestabilizador de estas estructuras. Para examinar si la síntesis de proteínas eucarióticas *de novo* juega un rol clave en la invasión bacteriana, se trataron a las HBMEC con ciclohexamida. Por último, para examinar el rol de la acidificación de los endosomas en el proceso de invasión bacteriana se realizaron los experimentos de internalización en presencia de monensina [234]. Para realizar los experimentos de inhibición de la invasión bacteriana, las HBMEC fueron pre-tratadas con los distintos inhibidores a diferentes concentraciones y posteriormente infectadas con *B. abortus*. Luego se cuantificó las UFC de los lisados celulares. Todos los inhibidores empleados repercutieron en la internalización de *B. abortus* a las HBMEC de una manera concentración dependiente (Figura 2). En conjunto, estos resultados sugieren que la

invasión de la HBMEC por *B. abortus* es dependiente de los microfilamentos de actina, los microtúbulos, la síntesis de proteínas *de novo* y la acidificación de los endosomas.

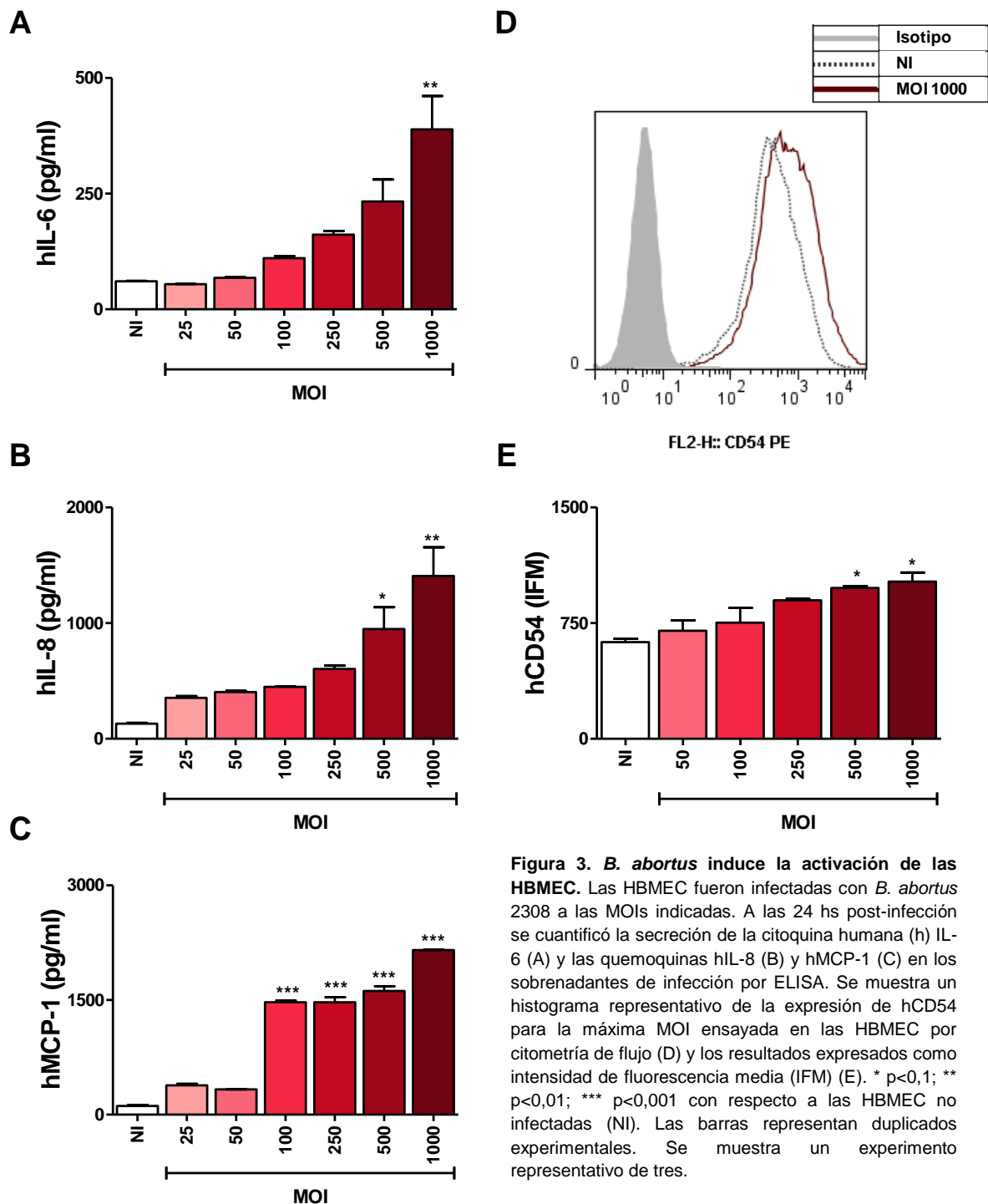


**Figura 2. *B. abortus* es internalizada activamente por las HBMEC.** Los diferentes inhibidores fueron adicionados, a las concentraciones indicadas, 1 hora previamente a la infección y mantenidos durante todo el período de infección. Luego del cultivo se realizaron lisados celulares de las HBMEC para cuantificar las UFC/ml bajo el tratamiento con citocalasina D (A), colchicina (B), ciclohexamida (C) y monensina (D). Se indica para cada inhibidor el control del vehículo en la máxima concentración ensayada. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$  con respecto a las HBMEC no tratadas (-) con inhibidor. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de dos. DMSO: Dimetil sulfóxido.

### ***B. abortus* induce una activación de las HBMEC.**

Una vez demostrado que *B. abortus* infecta y se replica en las HBMEC decidimos estudiar si, además, puede inducir la activación de las mismas. Para eso, evaluamos la capacidad de estas células de secretar citoquinas y quemoquinas, e inducir la expresión de la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1) frente a la infección bacteriana. La infección de las HBMEC con *B. abortus* resultó en un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la secreción de la citoquina IL-6, las quemoquinas, IL-8 y MCP-1; y un aumento en la expresión de CD54 en las HBMEC solamente a las máximas MOIs ensayadas. Si bien se observa que la activación fue dependiente de la MOI utilizada, ésta solo es significativa en las MOIs más elevadas

(Figura 3). En contraposición, las HBMEC fueron incapaces de secretar IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  luego de la infección (resultados no mostrados). Estos resultados indican que *B. abortus* induce una activación moderada de las HBMEC.



**Figura 3. *B. abortus* induce la activación de las HBMEC.** Las HBMEC fueron infectadas con *B. abortus* 2308 a las MOIs indicadas. A las 24 hs post-infección se cuantificó la secreción de la citoquina humana (h) IL-6 (A) y las quemoquinas hIL-8 (B) y hMCP-1 (C) en los sobrenadantes de infección por ELISA. Se muestra un histograma representativo de la expresión de hCD54 para la máxima MOI ensayada en las HBMEC por citometría de flujo (D) y los resultados expresados como intensidad de fluorescencia media (IFM) (E). \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a las HBMEC no infectadas (NI). Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres.

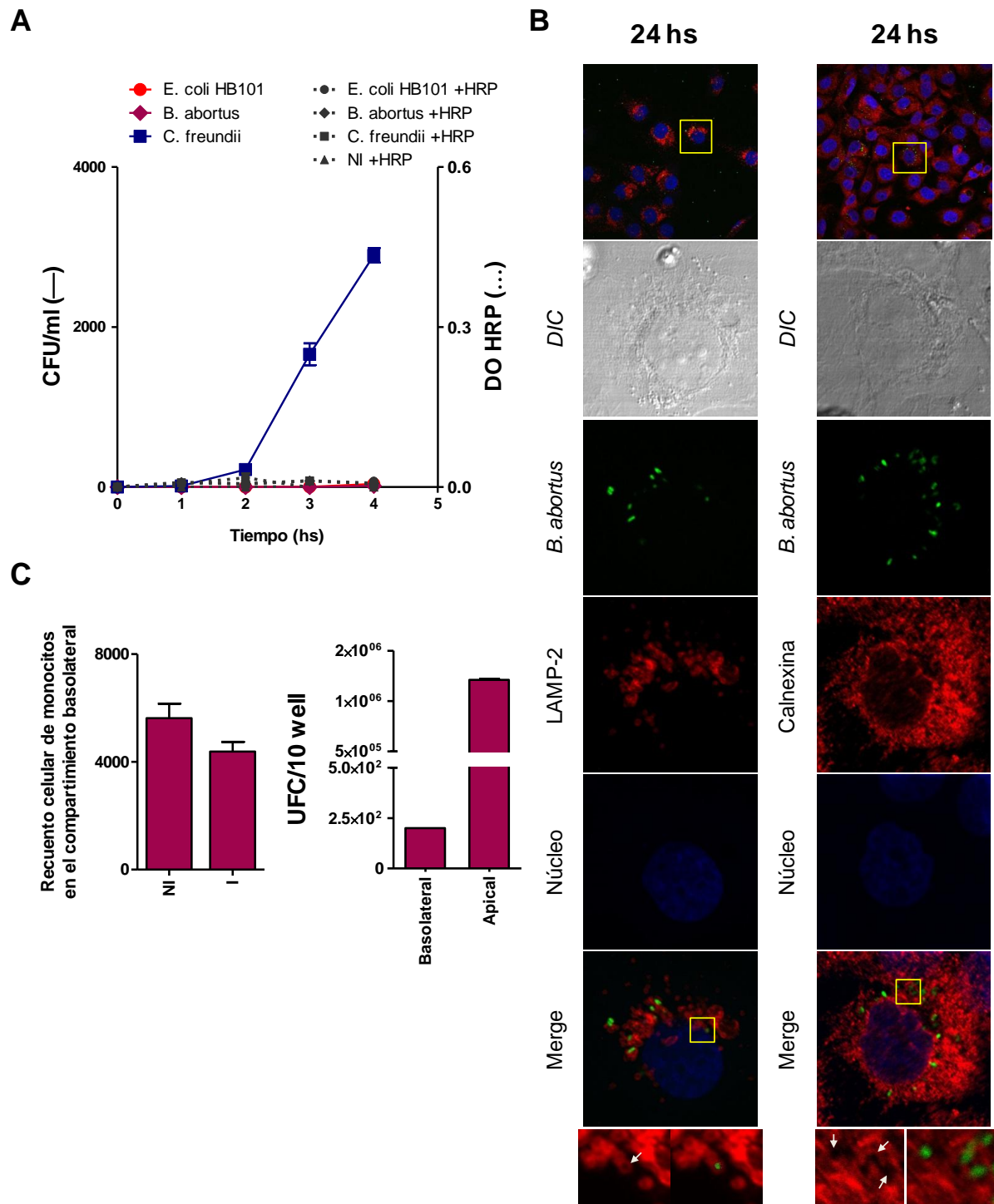
***B. abortus* atraviesa una monocapa polarizada de HBMEC por translocación facilitada en monocitos infectados (“Caballo de Troya”).**

Debido a que las bacterias del género *Brucella* han desarrollado varios mecanismos para sobrevivir y persistir dentro de la célula, no solo dentro de macrófagos sino también células no fagocíticas [34, 45, 209], es que podrían utilizar diferentes estrategias para atravesar la BHE. Sobre todo teniendo en cuenta los resultados aquí presentados que indican que la bacteria es capaz de infectar y multiplicarse en las HBMEC. Con el fin de dilucidar si *B. abortus* es capaz de traslocar a través de las HBMEC y cuál es el mecanismo que utiliza, empleamos un modelo *in vitro* basado en modelos previamente establecidos por otros grupos [227, 234]. El mismo implicó el cultivo de las HBMEC en un sistema de “transwell insert” que permite establecer un lado apical o luminal y un lado basolateral o abluminal de la monocapa celular (Ver MyM). Se adicionó al compartimento apical *B. abortus* y al cabo de un tiempo determinado se cuantificó en el compartimento basolateral el número de UFC/ml que lograron transmigrar a través de la monocapa. *Escherichia coli* HB101 se utilizó como un control por su característica de no ser capaz de atravesar la BHE mientras que *Citrobacter freundii* se utilizó como control positivo de una bacteria capaz de atravesar una monocapa de HBMEC [226, 234, 235]. Para evaluar la integridad de la monocapa y contemplar la difusión pasiva a través de la misma, simultáneamente con cada bacteria se adicionó en el compartimento apical del transwell la enzima peroxidasa (HRP de inglés “horseradish peroxidase”) cuya actividad fue, posteriormente, evaluada en el compartimento basolateral. Como se observa en la figura 4A, en las condiciones experimentales descritas, *C. freundii* logró atravesar la monocapa de HBMEC de manera dependiente del tiempo mientras que *E. coli* HB101 y *B. abortus* no lo hicieron. Los niveles de difusión de la enzima HRP fueron marginales y similares para todas las bacterias indicando que la migración de *C. freundii* ocurre, como ya fue descrito [226, 234], a través de la monocapa de HBMEC de manera transcelular, y que la integridad de la monocapa no está alterada en ninguno de los casos. Estos resultados indican que *B. abortus* es incapaz de transmigrar a través de las HBMEC utilizando el mecanismo transcelular o paracelular.

¿Cómo es posible que *B. abortus* tenga la capacidad de infectar a las HBMEC y aun así ser incapaz de atravesarlas por transcitosis? Posiblemente la causa que imposibilita la trans migración de *B. abortus* a través de la monocapa de HBMEC de manera transcelular se vincula a la habilidad de las bacterias de este género de escapar a la vía endocítica para establecer la rBCV, luego de la infección. Para determinar la localización subcelular de *B. abortus* en las HBMEC se utilizó *Brucella*-GFP. Diferentes compartimentos subcelulares fueron detectados mediante Acs primarios específicos y posteriormente revelados con un Ac

secundario conjugado a Alexa-546 (rojo) mediante microscopía confocal. Se observó que, a las 24 hs postinfección, *B. abortus* se encuentra rodeada de vacuolas LAMP-2<sup>+</sup> (marcadores de endosomas tardíos/lisosomas) o de vacuolas calnexina<sup>+</sup> (marcador de RE) en las HBMEC. Este fenómeno ya fue descrito por otros autores que observaron vacuolas LAMP-2<sup>+</sup>/ Calnexina<sup>+</sup> frente a la infección en macrófagos derivados de médula ósea a las 12 hs [55]. Sin embargo, nosotros observamos este fenómeno en las HBMEC recién a las 24 hs (Figura 4B). Estas diferencias podrían deberse al tipo celular involucrado. De esta manera, *B. abortus* evadiría la vía endocítica como ya fue expuesto por otros autores [49] y establecería su nicho replicativo luego de 24 hs de infección, siendo incapaz de atravesar de manera transcelular las HBMEC.

Se evaluó a continuación la posibilidad de que *B. abortus* utilizara el mecanismo denominado "Caballo de Troya" para transmigrar a través de una monocapa de HBMEC. Debido a que este mecanismo implica la trans migración facilitada por un leucocito, se empleó el mismo modelo *in vitro* pero evaluando la trans migración de *B. abortus* en el interior de un monocito infectado. Para ello, se adicionaron en compartimento apical de los "transwells insert" monocitos infectados o no con *B. abortus* y, al cabo de 4 hs, se evaluó la presencia de monocitos en el compartimento basolateral, y paralelamente, mediante el recuento de UFC intracelulares, la presencia de la bacteria en ambos compartimientos. Todo el experimento se realizó en presencia de antibióticos, por lo que las UFC que se enumeraron corresponden exclusivamente a bacterias intracelulares. La figura 4C muestra que si bien no hay diferencias significativas en el recuento celular entre monocitos infectados y no infectados que trans migraron a través de la monocapa, los monocitos infectados trans migraron hacia el compartimento basolateral, transportando *B. abortus* viable en su interior. Estos resultados demuestran que *B. abortus* trans migra a través de una monocapa de HBMEC por translocación facilitada por monocitos infectados.



**Figura 4. *B. abortus* utiliza el mecanismo “Caballo de Troya” para transmigrar a través de las HBMEC.** Las HBMEC fueron cultivadas en monocapa en “transwell insert”. Se adicionaron *B. abortus* 2308, *E. coli* HB101 o *C. freundii* en el compartimiento apical ( $1 \times 10^8$  bacterias). En los tiempos indicados se cuantificaron las UFC/ml y la actividad de HRP para cada bacteria en el compartimiento basolateral. Se muestra un experimento representativo de tres (A). Las HBMEC fueron infectadas con *Brucella*-GFP a MOI 100 por 24hs. Posteriormente se analizó por microscopía confocal la ubicación de *B. abortus* en los compartimientos subcelulares marcados con Acs primarios específicos para RE (Calnexina) y endosomas tardíos/lisosomas (LAMP-2) revelados con un Ac secundario marcado con Alexa-546 (rojo) (B). Se adicionaron  $1 \times 10^5$  monocitos infectados o no con *Brucella* a MOI 100 en el compartimiento apical (Apical) de un “transwell insert” con HBMEC. Al cabo de 4 hs se cuantificó la cantidad de monocitos que transmigraron y las UFC intracelulares presentes en ambos compartimientos (C). Se muestra experimento representativo de cuatro. La carga bacteriana fue calculada de un total de 10 wells. DO: densidad óptica. DIC: contraste de interferencia diferencial. Las barras representan duplicados experimentales.

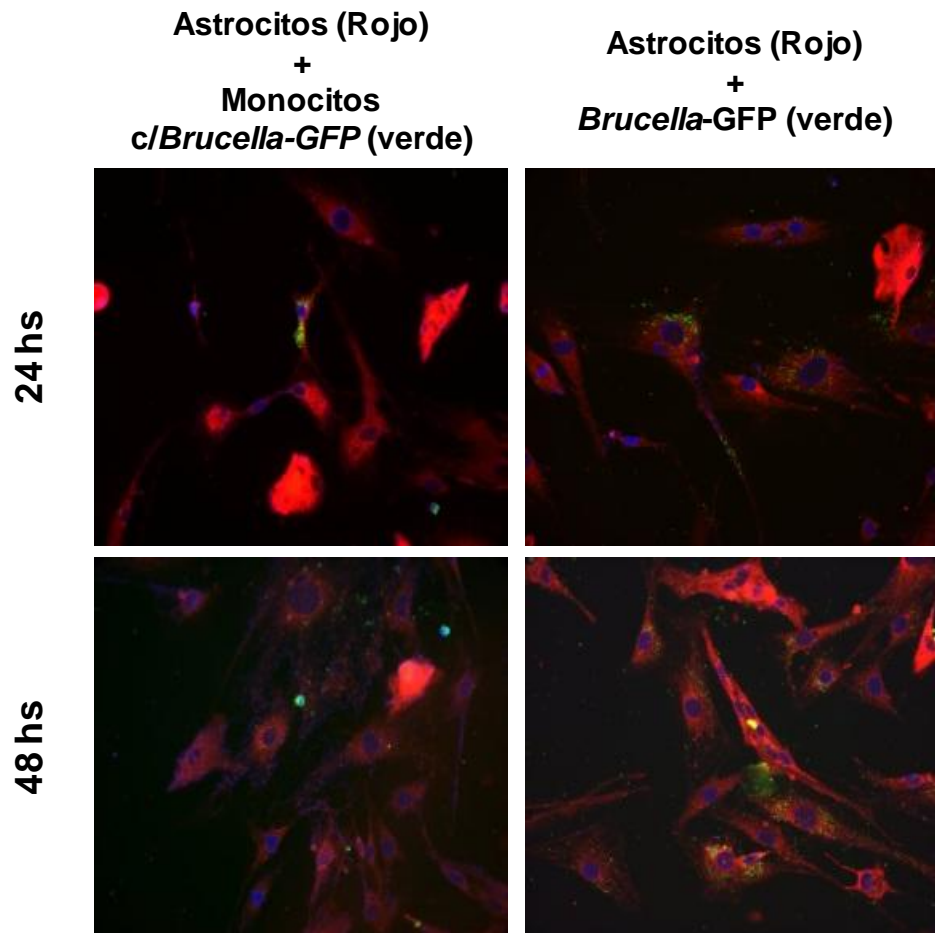
---

***El monocito infectado es fuente de bacteria para una infección de novo en astrocitos.***

Se ha postulado que una vez que *B. abortus* accede al SNC infecta células gliales que componen el parénquima cerebral y de esta manera desencadena una respuesta inmune innata inflamatoria [43]. Dado que hemos demostrado que *B. abortus* transmigra a través de una monocapa de HBMEC mediante el mecanismo "Caballo de Troya" nos preguntamos si sería capaz de infectar células gliales del parénquima al encontrarse alojada dentro de un monocito.

Considerando lo anteriormente expuesto, decidimos estudiar si *B. abortus* localizada dentro de un monocito podría ser una fuente de bacterias capaz de infectar a los astrocitos *de novo*. Para ello, a los cultivos primarios de astrocitos se le adicionaron monocitos infectados con *Brucella*-GFP. A las 24 y 48 hs se realizó la marcación de los co-cultivos utilizando un Ac anti-GFAP (marcador específico para astrocitos) revelado con un Ac secundario conjugado a Alexa-546 (Rojo) para determinar en qué tipo celular se encuentra presente *Brucella*-GFP. Se realizó también la infección del cultivo primario de astrocitos con *Brucella*-GFP como control de la infección directa. En la Figura 5 se puede observar presencia de *Brucella*-GFP dentro de los astrocitos (células GFAP positivas) a las 24 hs evidenciándose aún más a las 48hs, tanto cuando fueron infectados en forma directa como cuando la única fuente de bacteria fueron los monocitos infectados. Estos resultados indicarían que aun cuando la bacteria ingresa dentro de un monocito podría generar infección de otros tipos celulares adyacentes.





**Figura 5. Los monocitos infectados son fuente de bacteria para una infección *de novo* en astrocitos.**

Se adicionaron  $2 \times 10^4$  monocitos infectados con *Brucella-GFP* a MOI 100 sobre un cultivo primario de astrocitos durante 24 o 48 hs. Se marcaron los astrocitos con un Ac anti-GFAP revelado con un Ac secundario conjugado a Alexa-546 (rojo) para analizar por microscopia. Se realizo la infección directa de astrocitos con *Brucella-GFP* como control de infección directa.

## Discusión

Si bien se considera que el nicho intracelular preferencial de *Brucella* son las células fagocíticas profesionales, estas bacterias también son capaces de infectar fagocitos no profesionales. La capacidad infectiva de *B. abortus* está ampliamente descrita para diversos tipos celulares (osteoblastos, osteoclastos, hepatocitos, células estrelladas hepáticas, linfocitos B y T, y células de la glía) [41-47]. También ha sido descrita la interacción de *B. abortus* con modelos de células epiteliales [236-238] que componen una barrera especializada que, al igual que la BHE, limita la entrada de potenciales peligros al organismo: la barrera intestinal [192]. Incluso se ha descrito la interacción de *B. abortus* con células endoteliales de vasculatura periférica [48]. Nuestros resultados demuestran que *B. abortus* tiene la capacidad de adherirse, infectar y replicar en HBMEC, aportando nueva evidencia sobre la capacidad de la bacteria de sobrevivir dentro de células no fagocíticas.

La implicancia de la reestructuración de la actina durante la invasión celular por parte de *B. abortus* ya fue descrita como un factor clave en la invasión, internalización y tráfico intracelular de *Brucella* en células epiteliales [238]. En ese trabajo revelan que *Brucella* modula el reclutamiento y la pérdida de actina en la BCV: En las primeras fases del proceso de invasión recluta actina a la vacuola endocítica, que es posteriormente eliminada durante la fase de tráfico intracelular hasta que alcanza el nicho replicativo donde nuevamente recluta actina. En este estadio adquiere una estructura de tipo red que sería necesaria para conformar y mantener unidas las vacuolas replicativas [238]. Estos autores demuestran específicamente, que el tratamiento con citocalasina D desensambla las rBCV indicando que la polimerización de la actina es fundamental durante esta fase. La importancia de estos hallazgos se debe a que la susceptibilidad a adquirir la enfermedad está ligada al contacto con aerosoles como así también al consumo de alimentos contaminados provenientes de animales infectados, siendo importante el conocimiento sobre el progreso del proceso infeccioso en epitelios de la mucosa respiratoria y oral/gástrica [238]. En línea con estos resultados, la internalización de *B. abortus* tanto en una línea de células epiteliales alveolares como intestinales depende de la polimerización de actina, de los microtúbulos y parcialmente de la síntesis de proteína bacterianas *de novo* dado que el grado de infección se veía afectado ligeramente en presencia de Cloranfenicol, concluyendo no ser crítica para la eficiente internalización de la bacteria [237, 239]. En células epiteliales HeLa se demostró que la internalización de *Brucella* también involucra microtúbulos y que, la activación de GTPasas de la subfamilia Rho (reguladoras del citoesqueleto) es necesaria para la internalización de *Brucella* en fagocitos no profesionales [240]. Nuestros resultados hacen

foco en la interacción de *B. abortus* con la BHE e intentan esclarecer cómo es el proceso infeccioso sobre las células endoteliales de la microvasculatura cerebral. Utilizando inhibidores específicos de los componentes eucarióticos, pudimos dilucidar en nuestro modelo que la internalización bacteriana en las HBMEC también es un mecanismo activo y que no solo involucra a los microfilamentos de actina sino que también compromete a los microtúbulos, la síntesis de proteínas *de novo* y la acidificación de los endosomas, ampliando el espectro de tipos celulares en el que la bacteria utiliza estos mecanismos de internalización. Al igual que *B. abortus*, la invasión de *C. freundii* en esta línea celular también es dependiente de procesos relacionados a los microfilamentos de actina, a los microtúbulos, a la síntesis de proteínas *de novo* y a la acidificación de endosomas [234].

La infección con *B. abortus* de las HBMEC resultó en una leve activación de estas células, reflejado como un aumento moderado de la expresión de esta molécula de adhesión, la secreción de la citoquina proinflamatoria IL-6 y las quemoquinas, IL-8 y MCP-1. De todas maneras, cabe resaltar que en todos los parámetros de activación endotelial evaluados, el aumento sólo fue significativo con las MOIs más elevadas de infección.

Muchas bacterias han desarrollado mecanismos sofisticados para penetrar a través de la BHE vía paracelular, por transporte transcelular o por "Caballo de Troya" [241]. Si bien los microorganismos pueden explotar más de uno de estos mecanismos para acceder al SNC, las bacterias intracelulares utilizan típicamente la estrategia transcelular modificada por el hecho que la replicación bacteriana a menudo toma lugar dentro de las células endoteliales y el mecanismo "Caballo de Troya" [208]. El mecanismo transcelular requiere, en primer lugar, de la adhesión bacteriana a la células endoteliales o epiteliales, a través del reconocimiento de una adhesina de superficie bacteriana por un receptor en la célula diana que promueve la penetración intracelular y la colonización de la célula huésped [242]. Este tipo de mecanismo ha sido descrito para diversas bacterias, incluyendo *Escherichia coli* K1, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* [241]. Con respecto a *Brucella*, Castañeda Roldán y col. [242] identificaron una proteína de superficie, SP41, de 14 kDa asociada con la adherencia e invasión de células epiteliales HeLa sugiriendo que el mecanismo de ingreso de *Brucella* en células epiteliales requeriría de la presencia de una interacción ligando-receptor, como el mecanismo de cremallera (*zipper mechanism*), en lugar de la inyección de proteínas efectoras al interior de la célula huésped (*tigger mechanism*). Apoya esta observación la carencia en *Brucella* de un sistema de secreción de tipo III (T3SS) necesario para este último mecanismo. Adicionalmente, otros autores identificaron una región en *B. abortus*, que se encuentra altamente conservada en todas las especies de *Brucella*, involucrada en la adhesión e

invasión de las células del huésped [243]. La misma, recientemente, fue renombrada BigA al reportarla como una adhesina responsable de la adhesión a un epitelio polarizado conformado por células Caco2 y MDKC promoviendo la adhesión bacteriana al sitio de contacto célula-célula [238]. Si bien, todo indicaría que la adhesina BigA de *B. abortus* podría funcionar como un ligando que promueva la internalización bacteriana por interacción con un receptor, ninguno de estos trabajos ahonda en el mecanismo implicado en la trans migración de *B. abortus*. En el modelo de *C. freundii*, Badger y col. [234], considera que la acidificación de endosomas conjuntamente con la síntesis de proteínas podrían ser factores requeridos para desacoplar el complejo ligando-receptor, para la síntesis de los receptores celulares y/o la localización de los receptores en la superficie de las HBMEC responsables de la invasión por *C. freundii*. Sugieren que el contacto de la bacteria con las HBMEC estimula globalmente el agregado de los microtúbulos y este efecto también podría vincularse a la presentación de receptores celulares vía síntesis de proteínas de novo y acidificación de los endosomas debido el transporte de muchos receptores hacia y desde la superficie celular dependen de los microtúbulos [234]. Justifican que si bien no detectaron reorganización de los filamentos de actina, el agregado de los microtúbulos permanece debido a que ambas estructuras celulares están íntimamente interrelacionadas, funcionando los microtúbulos como estructuras de anclaje de la F-actina. Adicionalmente, los filamentos de actina son necesarios para señalización citosólica y/o la penetración bacteriana a la membrana plasmática [234]. En tal caso el efecto global de los inhibidores de componentes eucarióticos en la invasión por *C. freundii* podría reflejar una disminución de los receptores de las HBMEC que median su internalización. Nuestros resultados sobre la participación de los microfilamentos de actina y microtúbulos, la síntesis de proteínas *de novo* y la acidificación de los endosomas en la internalización de *B. abortus* a las HBMEC sumado a la descripción de posibles adhesinas bacterianas [238] contribuirían a la hipótesis de que *Brucella* necesita de la interacción ligando-receptor para invadir a la célula; de todos modos la implicancia de esta interacción es desconocida hasta el momento.

Si bien demostramos que *B. abortus* tiene la capacidad de infectar e internalizarse dentro de las HBMEC, nuestros resultados, utilizando un modelo diseñado en un sistema de "transwell insert", indican que *B. abortus* es incapaz de trans migrar utilizando el mecanismo transcelular. En concordancia con estas observaciones, resultados de Ferrero y col. [239] demuestran, utilizando un modelo similar al nuestro, que *B. abortus* es incapaz de translocar a través de una barrera de células epiteliales bronquiales humanas polarizadas utilizando el mecanismo paracelular o transcelular, a pesar de que *B. abortus* también invade y replica en estas células. Posiblemente la imposibilidad de utilizar este mecanismo se deba a que 24 hs

postinfección *B. abortus* se encuentra rodeada por vacuolas LAMP-2<sup>+</sup> o Calnexina<sup>+</sup> indicando que la bacteria está redireccionando su ubicación de la vía endocítica hacia un comportamiento replicativo, rBCV. Si bien otros autores muestran la coexpresión de vacuolas LAMP-2<sup>+</sup>/ Calnexina<sup>+</sup> a las 12 hs para macrófagos derivados de médula ósea [55], en las HBMEC este fenómeno se observó a las 24 hs. Estos autores analizan diferentes tiempos de infección y concluyen que una población temprana de BCVs expresando LAMP-2<sup>+</sup> /Calnexina<sup>+</sup> procede a la aparición de BCVs expresando solamente calnexina. Esto sería una evidencia de la maduración de la BCV ya que la presencia de una población intermedia indicaría que las vacuolas bacterianas maduran a rBCVs (Calnexina<sup>+</sup>) por exclusión progresiva de LAMP-2, posiblemente reciclando membranas LAMP-2<sup>+</sup> mientras interaccionan con RE [55, 56]. De esta manera, como ya fue expuesto por otros autores [49], *B. abortus* evadiría la vía endocítica y establecería su nicho replicativo siendo incapaz de realizar transitososis a través de las HBMEC.

Las bacterias que son capaces de sobrevivir dentro de una célula inmune periférica tendrían la habilidad de invadir SNC vía "Caballo de Troya" [241]. Las bacterias intracelulares establecen infección tomando ventaja del tráfico leucocitario fisiológico que entra al SNC [208]. Aún bajo condiciones de un estado estacionario del SNC, hay un bajo número de monocitos y linfocitos T y B que continuamente patrullan el SNC y aparentemente son capaces de atravesar la BHE intacta. El alto grado en el cuál *Brucella* se encuentra adaptada al ambiente intracelular sugiere que el ingreso al SNC facilitada por un fagocito es un mecanismo probable de infección. Si bien no observamos diferencias significativas en el recuento celular entre monocitos infectados y no infectados que transmigraron a través de la monocapa, se observó presencia de *B. abortus* como consecuencia de los monocitos infectados que transmigraron en un sistema de "transwell insert", transportando *B. abortus* viable en su interior. Los resultados expuestos en este capítulo son los primeros en describir que *B. abortus* utiliza el mecanismo "Caballo de Troya" para traslocar a través de una monocapa de HBMEC.

Finalmente, hemos demostrado la presencia de *Brucella* dentro de los, tanto cuando fueron infectados en forma directa como cuando la única fuente de bacteria fueron los monocitos infectados. Estos resultados indicarían que aun cuando la bacteria ingresa dentro de un monocito podría generar infección de otros tipos celulares adyacentes como ya ha sido sugerido para células epiteliales HeLa [56]. Los resultados obtenidos por Starr y col. demuestran que una vez que *Brucella* coopta membranas de RE para conformar la rBCV donde la bacteria replica, esta vacuola adquiere características autofágicas. Se demostró en células HeLa que la conversión de las rBCVs en aBCVs contribuiría a completar el ciclo

infeccioso de *Brucella* y se postuló que de esta manera, contribuiría a liberar a la bacteria hacia las inmediaciones, promoviendo la diseminación de células a célula y causando subsecuentemente la infección de células adyacentes [56]. Estas observaciones abren la oportunidad de estudiar el mecanismo por la cual la bacteria egresa de un tipo celular para generar infecciones subsiguientes en otros tipos celulares conformando un ciclo infeccioso desconocido hasta el momento.

## CAPITULO II

*“La  $IL-1\beta$  secretada por células gliales, infectadas con *B. abortus*, activa las células endoteliales de la microvasculatura cerebral”*

## Introducción

Si bien han sido descriptos los aspectos clínicos y diagnósticos que demuestran la existencia de una alteración de la BHE durante la neurobrucelosis [134, 162, 216, 217], los mecanismos patogénicos implicados en la activación de la BHE causada por *Brucella* no han sido investigados a nivel celular y molecular. A pesar de que se estima que una de las causas de la patología podría ser la acción directa de la bacteria [155, 162], los resultados presentados en el Capítulo I indican que la infección de HBMEC induce una activación moderada de las mismas y solo significativa a MOIs muy elevadas, poco probables de ser encontradas *in vivo*.

Alternativamente la activación patológica de la BHE podría ser la causa de la respuesta inflamatoria desencadenada por la bacteria al activar a los componentes de la glía. La activación de la respuesta inmune por las células de la glía y la consecuente secreción de citoquinas proinflamatorias es clave en la activación del endotelio cerebral [172, 244] y en la pérdida de la integridad del mismo [245, 246].

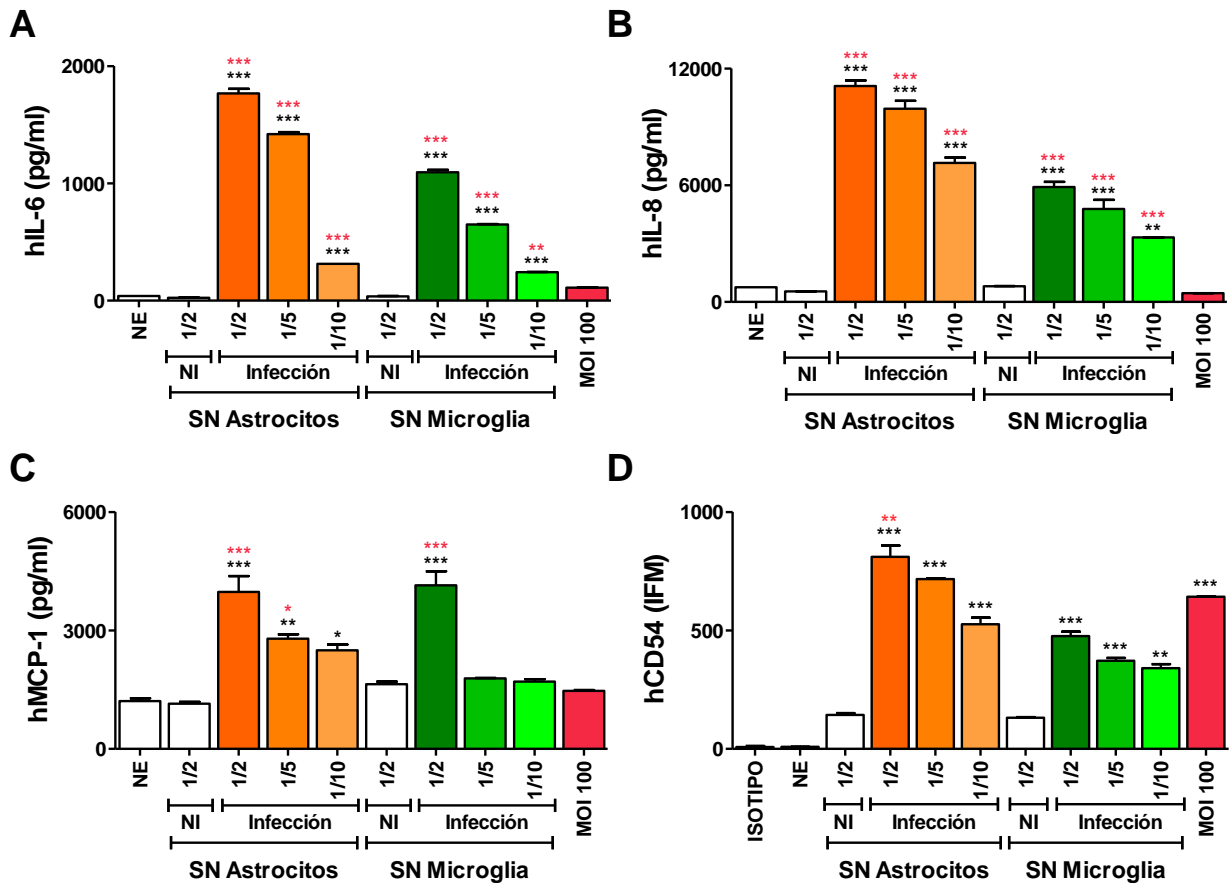
Resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que, durante la infección por *B. abortus*, las células gliales secretan citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  [43]. Además se ha determinado que la presencia de inflamación es un signo característico de la patogénesis de la neurobrucelosis [247, 248]. Considerando todo lo expuesto, postulamos que los astrocitos y la microglía se encuentran en una posición clave para influenciar la integridad de la BHE. De esta manera, **la respuesta inmunológica desencadenada por las células gliales podría tener efectos fundamentales sobre la activación de la microvasculatura cerebral y la integridad de la BHE una vez que *B. abortus* accede al parénquima cerebral**. El objetivo de este segundo capítulo se centra específicamente en investigar cómo la inmunidad innata desencadenada por células gliales infectadas con *B. abortus* afecta a la activación y la integridad de la BHE.



## Resultados

### ***El sobrenadante de células gliales infectadas con *B. abortus* induce la activación de las células endoteliales de la microvasculatura cerebral.***

Las células gliales secretan factores solubles frente a la infección con *B. abortus* [43] que podrían tener algún efecto en la activación de células de la microvasculatura cerebral. Por tal motivo, decidimos investigar si las citoquinas proinflamatorias secretadas por astrocitos y microglía ante la infección con *B. abortus* tenían algún efecto en la activación de las HBMEC. Dicha activación fue evaluada por la habilidad de estas células de secretar citoquinas y quemoquinas; y por la capacidad de inducir la expresión de la molécula de adhesión CD54 (ICAM-1). La adición de diferentes diluciones del sobrenadante de astrocitos y microglía infectados con *B. abortus* a HBMEC no infectadas indujo un aumento significativo en la secreción de IL-6, IL-8 y MCP-1, y en la expresión de CD54, comparado con las HBMEC no estimuladas o con respecto a las HBMEC estimuladas con sobrenadantes de astrocitos y microglía sin infectar ( $p < 0,001$ ) (Figura 6). A su vez, esta activación fue significativamente mayor ( $p < 0,001$ ) a la generada cuando las células se encuentran infectadas directamente con *B. abortus* a MOI 100 (Figura 6). Debido a que los Acs de los kits de Elisa comerciales para detectar citoquinas y quemoquinas humanas no tienen reactividad cruzada con citoquinas y quemoquinas murinas (datos no mostrados), podemos asegurar que los factores detectados en el sobrenadante de las HBMEC estimuladas con los sobrenadantes de las células gliales corresponden exclusivamente a factores humanos secretados por las HBMEC y no a factores murinos ya presentes en el sobrenadante de infección de las células gliales utilizado para estimular. Estos resultados indican que las células de la glía infectadas con *B. abortus* secretan factores que son capaces de activar en mayor medida a las HBMEC en comparación con la infección directa con la bacteria.

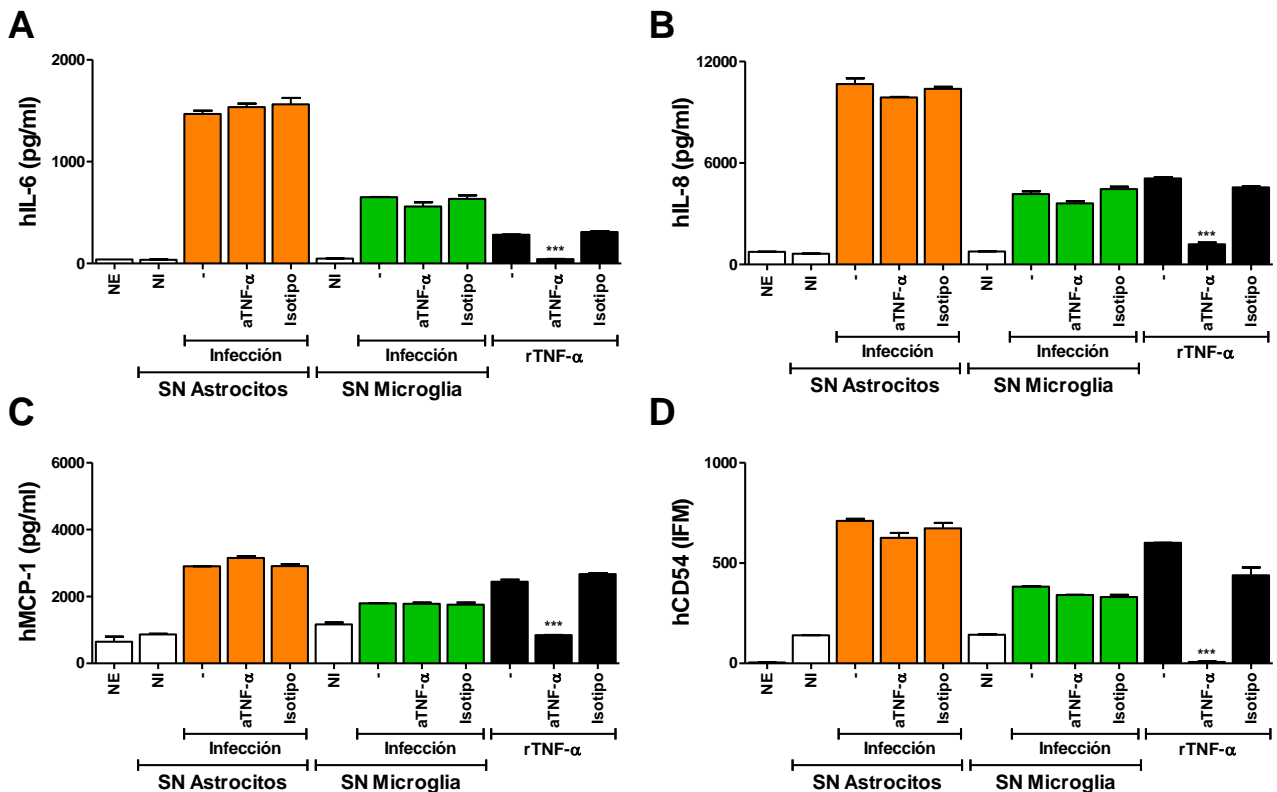


**Figura 6. El sobrenadante de células gliales infectadas con *B. abortus* induce la activación de las HBMEC.** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con sobrenadante de astrocitos (SN Astrocitos) o microglía (SN microglía) infectados o no (NI) con *B. abortus* a las diluciones indicadas. Las HBMEC también fueron infectadas con *B. abortus* (MOI 100) como control. La secreción de la citocina humana (h) IL-6 (A) y las quemoquinas hIL-8 (B) y hMCP-1 (C) por las HBMEC fue determinada por ELISA. La expresión de hCD54 fue determinada en las HBMEC por citometría de flujo. Los resultados están expresados como intensidad de fluorescencia media (IFM) (D). \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a la estimulación de las HBMEC con el correspondiente sobrenadante no infectado (NI). En asteriscos rojos, misma significancia, con respecto a la infección directa. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados. NE: no estimulado.

### ***TNF- $\alpha$ no se encuentra involucrado en la activación de las HBMEC por las células gliales infectadas con *B. abortus*.***

Nuestros resultados indican que un factor soluble, secretado por las células gliales frente a la infección con *B. abortus*, podría estar involucrado en la activación de las HBMEC. Tanto  $TNF-\alpha$  como  $IL-1\beta$  han sido descritas como las principales citocinas implicadas en la activación de la microvasculatura cerebral y responsables del aumento de la permeabilidad de la barrera hematoencefálica [172, 200, 249]. Dado que, ambas citocinas son producidas por astrocitos y microglía en respuesta a la infección con *B. abortus* [43], decidimos investigar el rol de estas citocinas en la activación de las HBMEC. En primer lugar, enfocamos la investigación en el rol de  $TNF-\alpha$ . Para ello, los sobrenadantes de

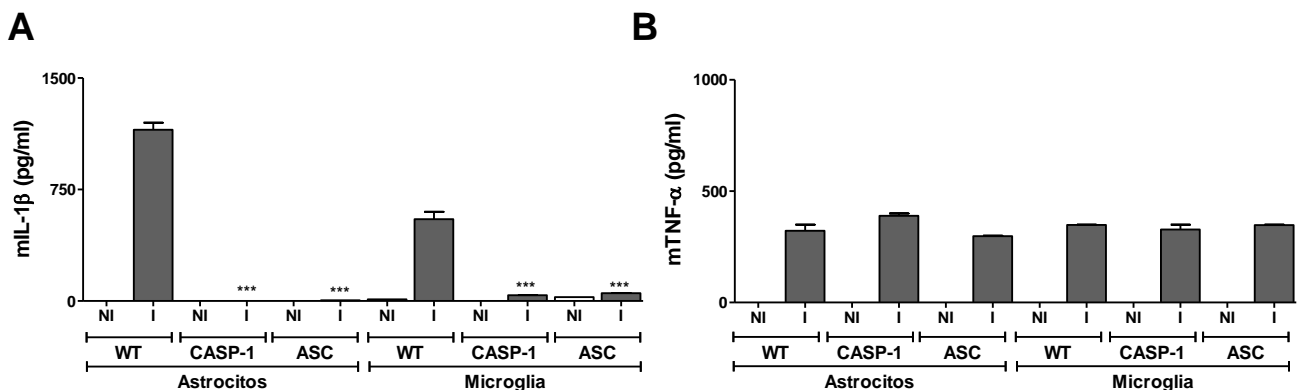
infección de astrocitos y microglía fueron pre-incubados con un Ac neutralizante anti-TNF- $\alpha$  para evaluar la habilidad de esta citoquina en inducir la activación de las HBMEC. Ni el Ac neutralizante, ni el control de isotipo tuvieron algún efecto en la activación de las HBMEC producida por la estimulación con sobrenadante de células gliales infectadas con *B. abortus* (Figura 7). La capacidad de neutralización del Ac anti-TNF- $\alpha$  fue confirmada bloqueando la activación inducida por concentraciones suprafisiológicas de la citoquina recombinante TNF- $\alpha$  (Figura 7). Estos resultados indican que el TNF- $\alpha$  no está involucrado en la activación de las HBMEC mediada por las células gliales infectadas con *B. abortus*.



**Figura 7. La activación de las HBMEC no depende de TNF- $\alpha$ .** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con sobrenadante de astrocitos (SN astroitos) y microglía (SN microglía) no infectados (NI) o con sobrenadantes de células gliales infectadas con *B. abortus* sin tratar (-), pre-incubados con un Ac neutralizante anti-TNF- $\alpha$  (aTNF- $\alpha$ ) o pre-incubados con el control de isotipo (Isotipo). La estimulación de las HBMEC con la citoquina recombinante de TNF- $\alpha$  (rTNF- $\alpha$ , 5 ng/ml) fue utilizada como control. Se analizó la secreción de hIL-6 (A), hIL-8 (B), hMCP-1 (C) por las HBMEC mediante ELISA y la expresión de hCD54 en las HBMEC por citometría de flujo (D), expresando los resultados, en este caso, como intensidad de fluorescencia media (IFM). \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a la estimulación con el sobrenadante de infección sin tratamiento (-). NE: HBMEC no estimuladas. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

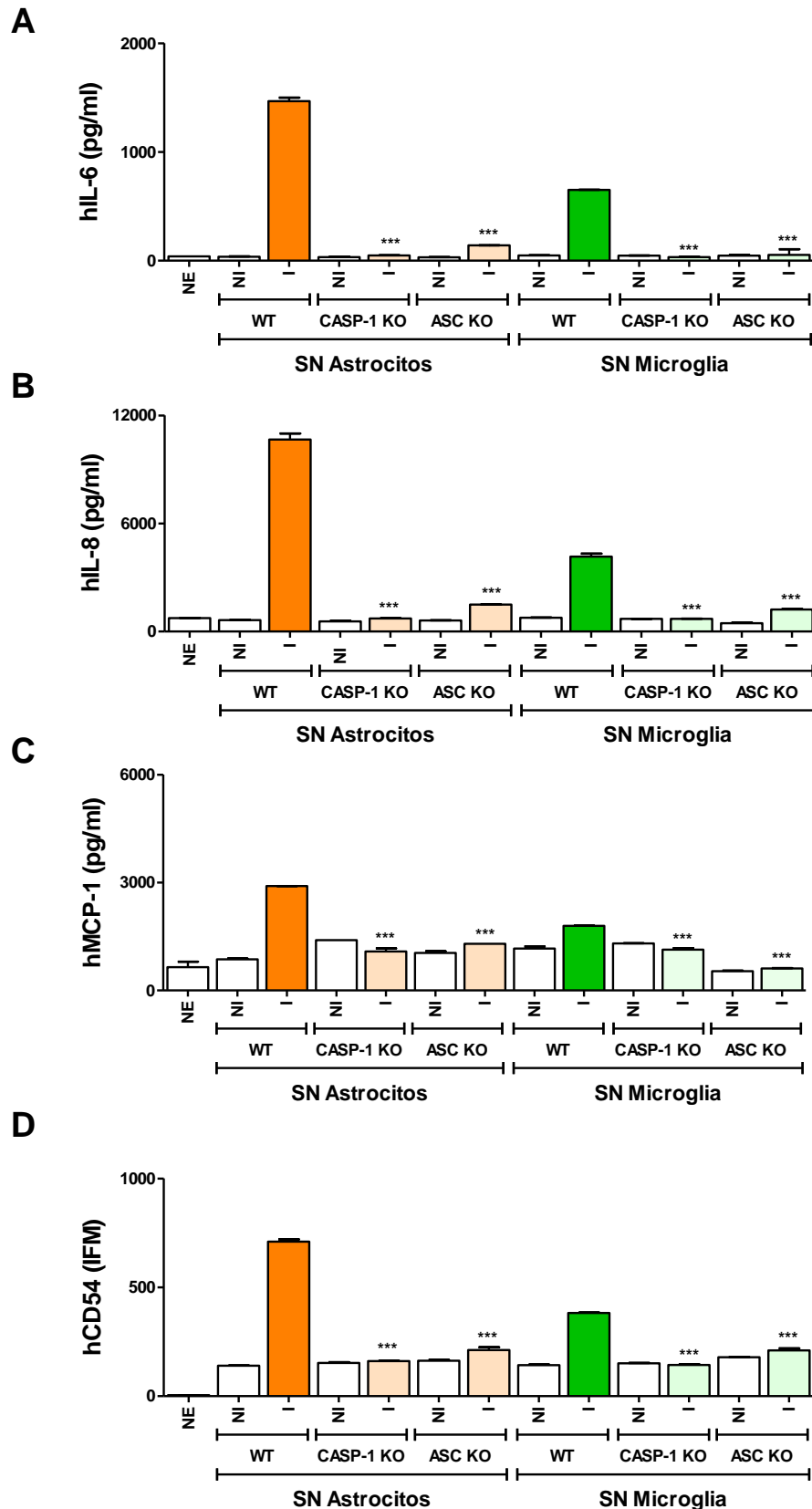
### **La activación de las HBMEC por las células gliales infectadas con *B. abortus* es mediada por IL-1 $\beta$ .**

A continuación, nos enfocamos en el rol de IL-1 $\beta$  sobre la activación de las HBMEC. Para ello, utilizamos cultivos primarios de células gliales provenientes de ratones deficientes (KO del inglés "Knock out") en las moléculas ASC (del inglés "Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD") y caspasa-1 (Casp-1). ASC es una proteína adaptadora que forma parte de diferentes inflammasomas que funciona como nexo entre las señales desencadenadas por los patógenos y la posterior activación de CASP-1 que conlleva al clivaje proteolítico de pro-IL-1 $\beta$  y la consecuente producción de esta citoquina, entre otras [96]. Infectamos estos cultivos para obtener el sobrenadante de infección que, posteriormente, fue empleado para estimular a las HBMEC. La secreción de IL-1 $\beta$ , inducida por la infección con *B. abortus*, fue completamente inhibida en los sobrenadantes de astrocitos y microglía provenientes de ratones KO para CASP-1 y ASC en comparación con los sobrenadantes de células gliales provenientes de ratones salvajes (WT del inglés "wild type"). Por el contrario, la secreción de la citoquina TNF- $\alpha$  no se vio alterada (Figura 8).



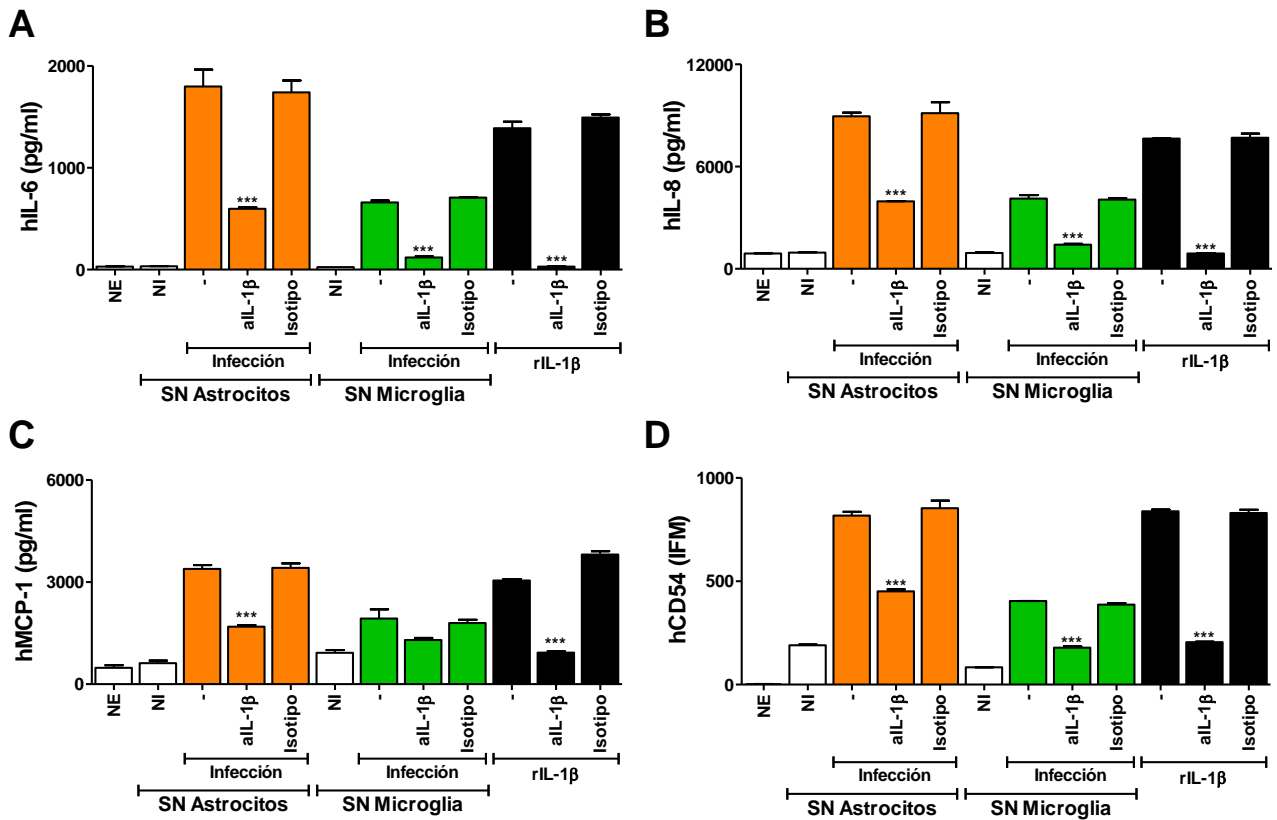
**Figura 8. CASP-1 y ASC están implicados en la secreción de IL-1 $\beta$  por células gliales infectadas con *B. abortus*.** Cultivos primarios de astrocitos y microglía proveniente de ratones WT, y ratones KO en caspasa-1 (CASP-1) y ASC fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100). Se evaluó la secreción de las citoquinas murinas (m), IL-1 $\beta$  (A) y mTNF- $\alpha$  (B), por las células gliales a 24 hs post-infección por ELISA. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al sobrenadante de infección (I) de ratones WT. Las barras representan duplicados experimentales. NI: no infectado.

Quando estimulamos a las HBMEC con los sobrenadantes de infección de astrocitos y microglía provenientes de ratones WT, se observó un aumento significativo en la secreción de la citoquina IL-6 y las quemoquinas IL-8 y MCP-1, y en la expresión de CD54. En contraposición, los sobrenadantes de infección de astrocitos y microglía provenientes de ratones KO, tanto para CASP-1 como para ASC, fueron incapaces de inducir la activación de las HBMEC (Figura 9).



**Figura 9. La activación de las HBMEC por las células gliales requiere de CASP-1 y ASC.** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con sobrenadantes de astrocitos (SN astrocitos) y microglía (SN microglía) provenientes de ratones WT o KO en caspasa-1 (CASP-1) o ASC, infectados (I) o no (NI) con *B. abortus*. Se analizó la secreción de hIL-6 (A), hIL-8 (B), hMCP-1 (C) por las HBMEC mediante ELISA y la expresión de hCD54 en las HBMEC por citometría de flujo (D), expresando los resultados intensidad de fluorescencia media (IFM). \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a la estimulación con el sobrenadante proveniente de ratones WT e infectados con la bacteria (I). NE: HBMEC no estimuladas. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

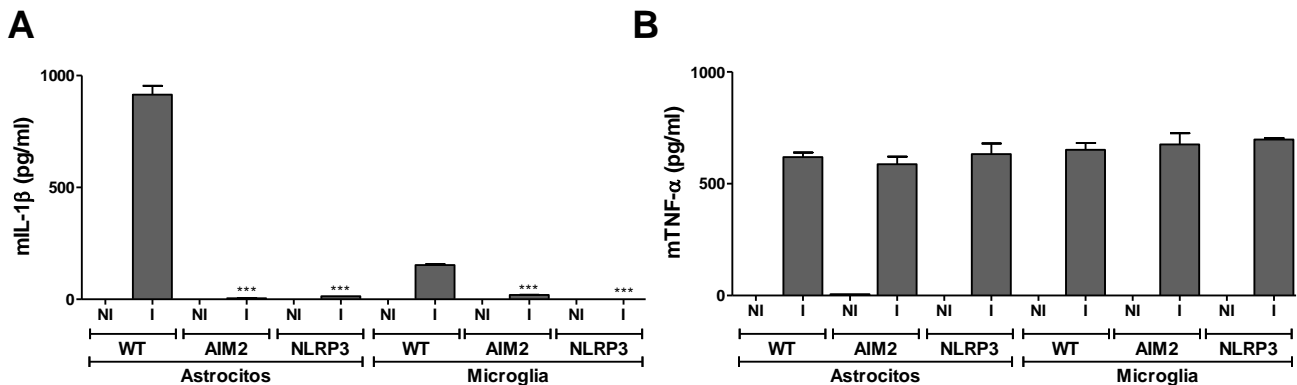
Debido a que el inflamasoma está implicado en el procesamiento de otras citoquinas, como IL-18 e IL-33 [96], decidimos corroborar la función de IL-1 $\beta$  en la activación de las HBMEC mediante experimentos de neutralización. Para esto, los sobrenadantes de infección de astrocitos y microglía provenientes de ratones WT fueron pre-incubados con un Ac neutralizante anti-IL-1 $\beta$  o su control de isotipo. Se observó que la neutralización de la citoquina IL-1 $\beta$  presente en los sobrenadantes de infección de células gliales disminuyó significativamente la activación de las HBMEC (Figura 10). La citoquina recombinante de IL-1 $\beta$ , utilizada como control positivo, indujo la activación de las HBMEC; activación que fue suprimida ( $p < 0,001$ ) en presencia del Ac neutralizante anti-IL-1 $\beta$  (Figura 10). Estos resultados indican que IL-1 $\beta$  inducida por *B. abortus* en las células gliales está involucrada en la activación de las células de la microvasculatura cerebral.



**Figura 10. La activación de las HBMEC por el sobrenadante de células gliales infectadas con *B. abortus* es mediada por IL-1 $\beta$ .** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con sobrenadante de astrocitos (SN astrocitos) y microglía (SN microglía) no infectados (NI) o con sobrenadantes de células gliales infectadas *B. abortus* sin tratar (-), pre-incubados con un Ac neutralizante anti-IL-1 $\beta$  (aIL-1 $\beta$ ) o pre-incubados con el control de isotipo (Isotipo). La estimulación de las HBMEC con la citoquina recombinante de IL-1 $\beta$  (rIL-1 $\beta$ , 500 pg/ml) fue utilizada como control. La secreción de hIL-6 (A), hIL-8 (B), hMCP-1 (C) por las HBMEC fue determinada por ELISA y la expresión de hCD54 en las HBMEC fue analizada por citometría de flujo (D) expresando los resultados como intensidad de fluorescencia media (IFM). \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a la estimulación de las HBMEC con el sobrenadante de infección no tratado (-). NE: HBMEC no estimuladas. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de dos realizados.

**La activación de las HBMEC, inducida por la IL-1 $\beta$  secretada por las células gliales, requiere de los inflammasomas AIM2 y NLRP3.**

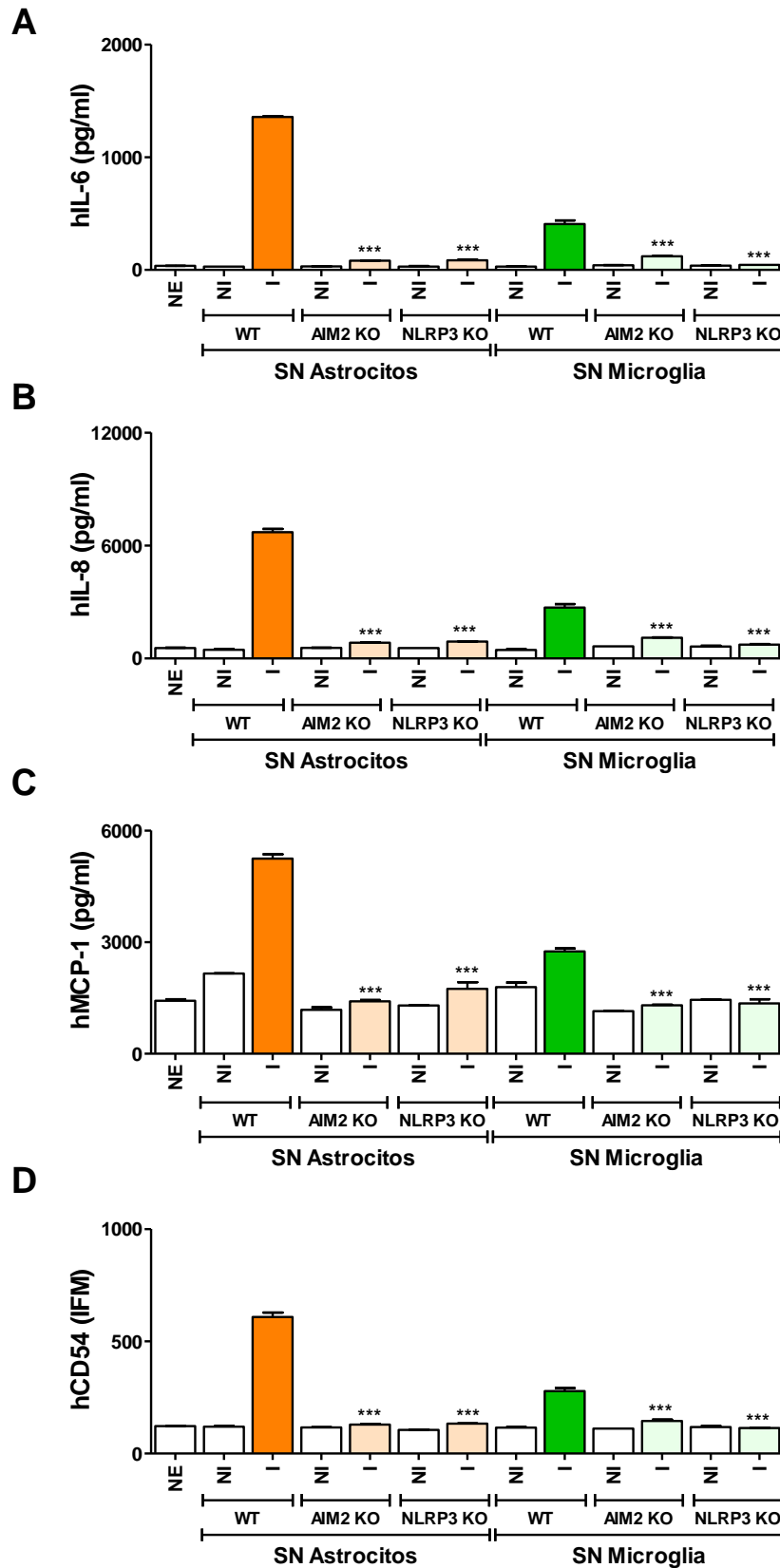
Los resultados previos sugieren que la molécula adaptadora ASC es esencial para desencadenar la respuesta a través de CASP-1 por las células gliales infectadas con *B. abortus*; motivo por el cual un receptor de tipo NLR estaría implicado en la secreción de IL-1 $\beta$  y la consecuente activación de las HBMEC. Recientemente, fue demostrado que la secreción de IL-1 $\beta$  en macrófagos murinos infectados con *B. abortus* se produce a través de los inflammasomas AIM2 (del inglés "Absent in melanoma 2") y NLRP3 e independientemente de NLRC4 [99]. En base a esto, decidimos investigar si NLRP3 y AIM2 son importantes para la activación del inflammasoma y la secreción de IL-1 $\beta$  frente a la infección con *B. abortus*, en los cultivos primarios de astrocitos y microglía. Para ello, utilizamos cultivos primarios de células gliales provenientes de ratones WT y ratones KO para NLRP3 o AIM2. Se obtuvo el sobrenadante de infección que, posteriormente, fue empleado para estimular a las HBMEC. La secreción de IL-1 $\beta$ , inducida por la infección con *B. abortus*, fue completamente inhibida en astrocitos y microglía provenientes de ratones KO para NLRP3 y AIM2 en comparación con los sobrenadantes de células gliales provenientes de ratones WT. Por el contrario, la secreción de la citoquina TNF- $\alpha$  no se vio alterada por la ausencia de dichas proteínas (Figura 11). Estos resultados indican que la secreción de IL-1 $\beta$  por células gliales infectadas con *B. abortus* depende de la activación de los NLRP3 y AIM2.



**Figura 11. Los inflammasomas AIM2 y NLRP3 están implicados en la secreción de IL-1 $\beta$  por las células gliales infectadas con *B. abortus*.** Cultivos primarios de astrocitos y microglía proveniente de ratones WT, y ratones KO en NLRP3 y AIM2 fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100). Se evaluó la secreción de las citoquinas murinas (m) IL-1 $\beta$  (A) y mTNF- $\alpha$  (B), por las células gliales a 24 hs post-infección por ELISA. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto al sobrenadante de infección (I) de ratones WT. Las barras representan duplicados experimentales.

Nuevamente, cuando estimulamos HBMEC con los sobrenadantes de infección de astrocitos y microglía provenientes de ratones WT se observó un aumento significativo en la secreción de la citoquina IL-6, las quemoquinas IL-8 y MCP-1 y en la expresión de CD54. En contraposición, los sobrenadantes de infección de astrocitos y microglía provenientes de ratones KO, tanto para NLRP3 como para AIM2, fueron incapaces de inducir la activación de las HBMEC (Figura 12). Estos resultados indican que los inflamasomas AIM2 y NLRP3 activados en las células gliales ante la infección con *B. abortus*, cumplen una función crítica en la activación de las HBMEC, por efecto de la secreción de IL-1 $\beta$ .

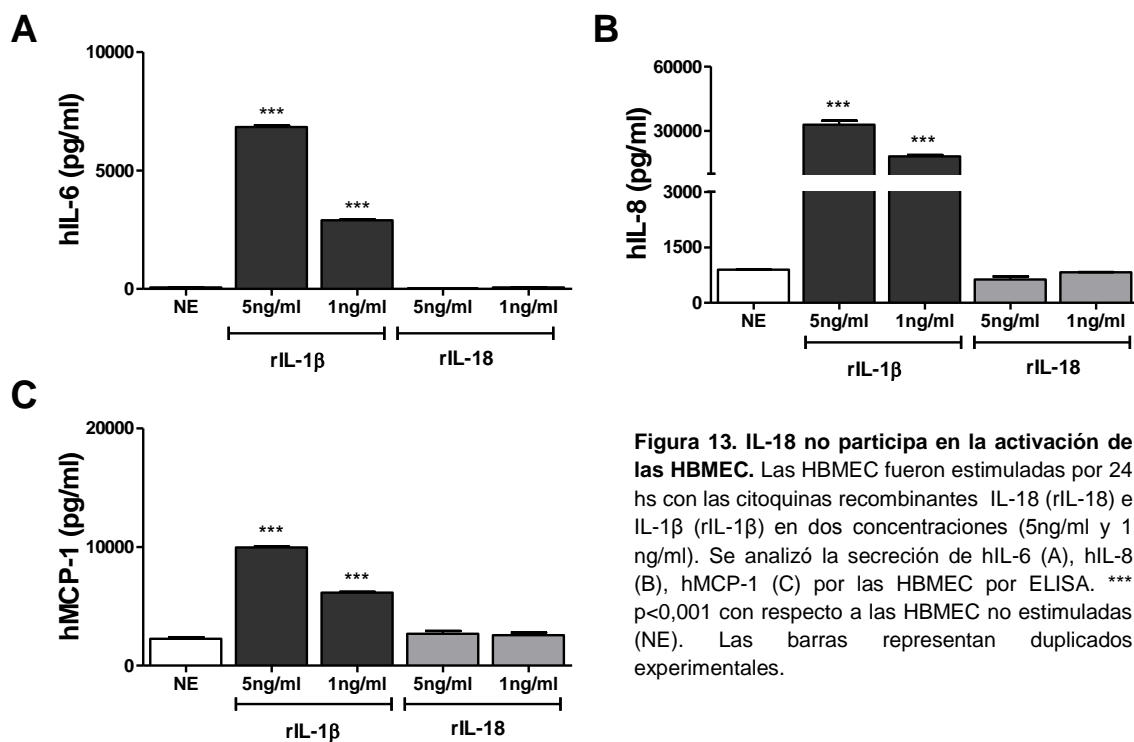




**Figura 12. La activación de las HBMEC por las células gliales requiere de NLRP3 y AIM2.** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con sobrenadantes de astrocitos (SN astrocitos) y microglía (SN microglía) provenientes de ratones WT o KO en los inflammasomas NLRP3 y AIM2, infectados (I) o no (NI) con *B. abortus*. Se analizó la secreción de hIL-6 (A), hIL-8 (B), hMCP-1 (C) por las HBMEC mediante ELISA y la expresión de hCD54 en las HBMEC por citometría de flujo (D), expresando los resultados como intensidad de fluorescencia media (IFM). \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a la estimulación con el sobrenadante proveniente de ratones WT e infectados con la bacteria. NE: HBMEC no estimuladas. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

### **La citoquina IL-18 no participa como mediador en la activación de las HBMEC.**

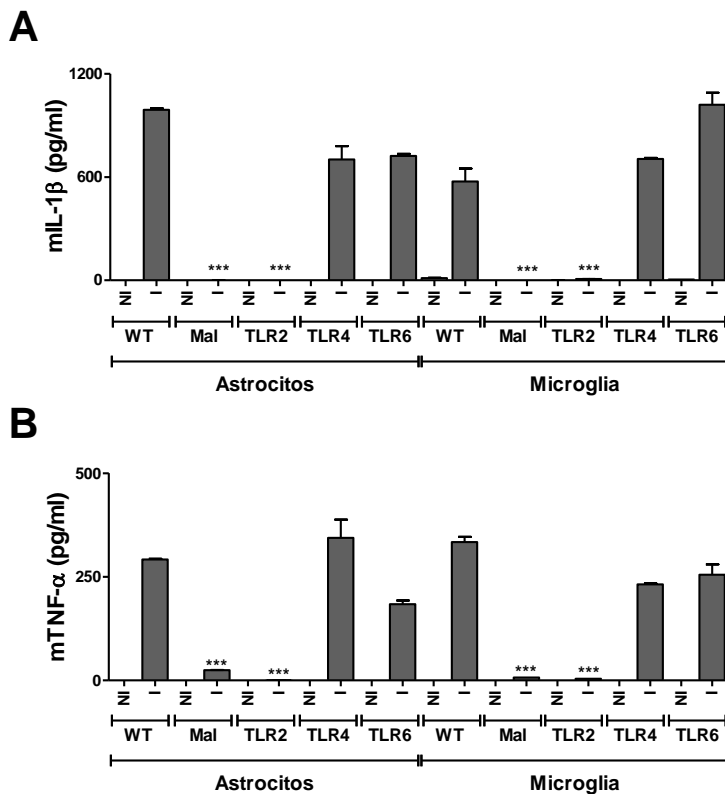
Como mencionamos anteriormente, existen otras dos citoquinas que son capaces de ser procesadas como consecuencia de la activación de los inflammasomas: IL-18 e IL-33. La IL-33 ha sido implicada en respuestas de tipo Th2, mientras que la IL-18 ha sido vinculada predominantemente al desarrollo de una respuesta inmune celular, actuando sinérgicamente con IL-12 para estimular la producción de INF- $\gamma$  por linfocitos y como consecuencia dirigir hacia una respuesta de tipo Th1 [250-252], siendo fundamental este tipo de respuesta frente a la infección con *Brucella*. Si bien, ya fue descripto anteriormente el rol principal de IL-1 $\beta$  sobre la activación de las HBMEC, decidimos estudiar la potencial implicancia de IL-18 en la activación de estas células. Para esto, estimulamos HBMEC con la citoquina recombinante IL-18, utilizando como control positivo IL-1 $\beta$  recombinante. Mientras que la estimulación con IL-1 $\beta$  indujo un aumento significativo de IL-6, IL-8 y MCP-1, la estimulación con IL-18 fue incapaz de inducir la activación de las HBMEC (Figura 13). Esto demuestra que IL-18 no se encuentra involucrada en la activación de las HBMEC siendo la única responsable IL-1 $\beta$ .



**Figura 13. IL-18 no participa en la activación de las HBMEC.** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con las citoquinas recombinantes IL-18 (rIL-18) e IL-1 $\beta$  (rIL-1 $\beta$ ) en dos concentraciones (5ng/ml y 1 ng/ml). Se analizó la secreción de hIL-6 (A), hIL-8 (B), hMCP-1 (C) por las HBMEC por ELISA. \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a las HBMEC no estimuladas (NE). Las barras representan duplicados experimentales.

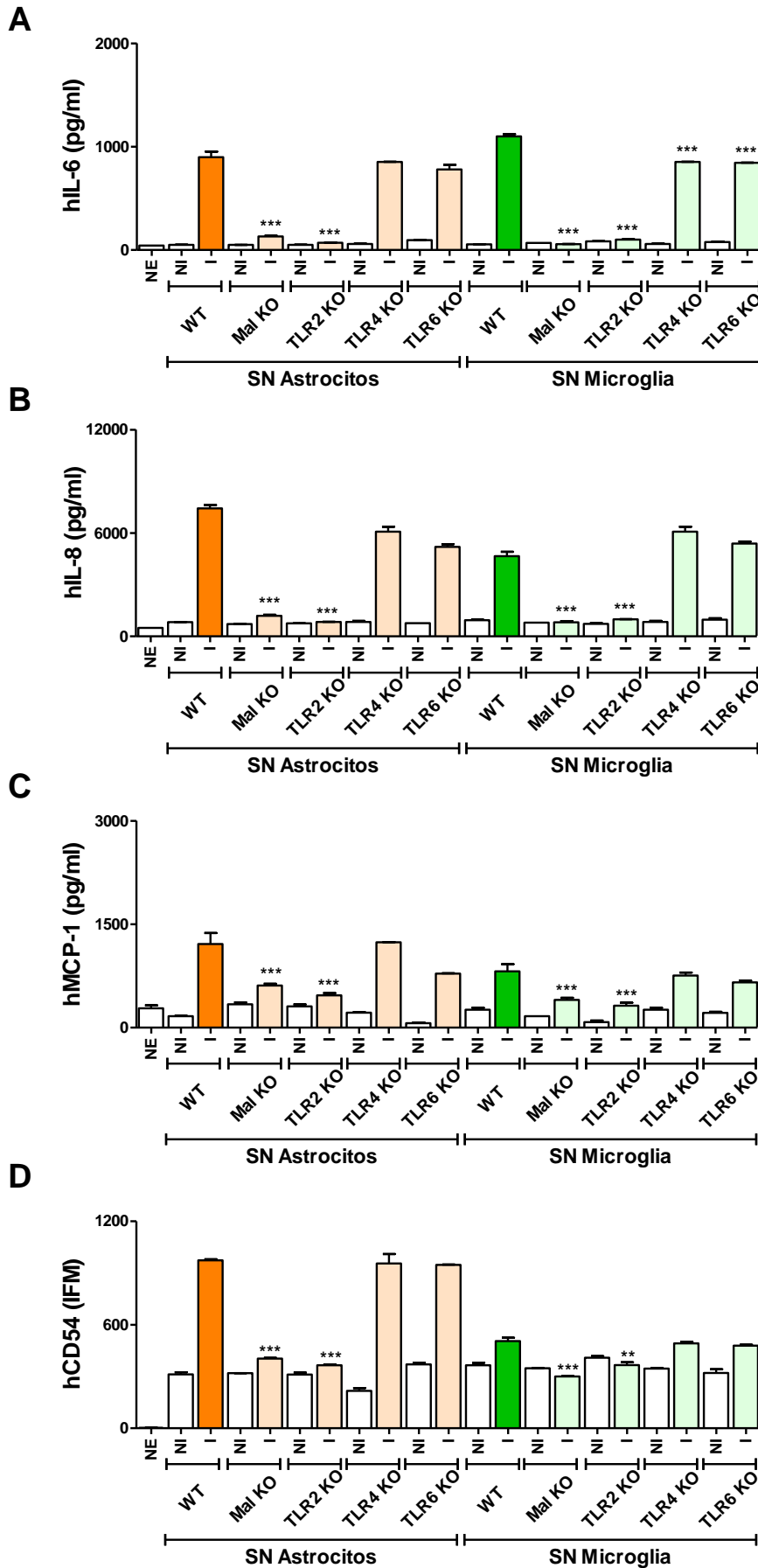
***TLR2 determina la producción de IL-1 $\beta$  por las células gliales, en respuesta a la infección con *B. abortus*, con la consecuente activación de las HBMEC.***

Para la producción de IL-1 $\beta$ , los TLRs y los NLRs tienen que funcionar en conjunto. Los TLRs inducen la expresión del precursor de la citoquina, la pro-IL-1 $\beta$ , que posteriormente es procesada proteolíticamente a su forma activa, por la acción de CASP-1 dependiente de la activación de NLRs. Luego de la maduración de la citoquina, la misma se secreta [96]. Para evaluar el requerimiento de la señalización a través de un TLR para la producción de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección con *B. abortus*, infectamos células gliales provenientes de ratones WT y células gliales provenientes de ratones KO para Mal/TIRAP, TLR2, TLR4 y TLR6 y luego medimos la secreción de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en el sobrenadante de infección. Tanto la secreción de IL-1 $\beta$  como de TNF- $\alpha$  fue completamente abrogada en el sobrenadante de infección de astrocitos y microglía provenientes de ratones KO para TLR2 y la molécula adaptadora Mal/TIRAP. Por el contrario, células gliales provenientes de ratones KO para TLR4 y TLR6 produjeron cantidades similares de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  a las producidas por células gliales provenientes de ratones WT (Figura 14).



**Figura 14. TLR2 y TLR4 están implicados en la secreción de IL-1 $\beta$  por las células gliales infectadas con *B. abortus*.** Cultivos primarios de astrocitos y microglía proveniente de ratones WT, y ratones KO en Mal/TIRAP (Mal), TLR2, TLR4 y TLR6 fueron infectados con *B. abortus* (MOI 100). Se evaluó la secreción de las citoquinas murinas (m) IL-1 $\beta$  (A) y mTNF- $\alpha$  (B), por las células gliales a 24 hs post-infección por ELISA. \*\*\* p<0,001 con respecto al sobrenadante de infección (I) de ratones WT. Las barras representan duplicados experimentales.

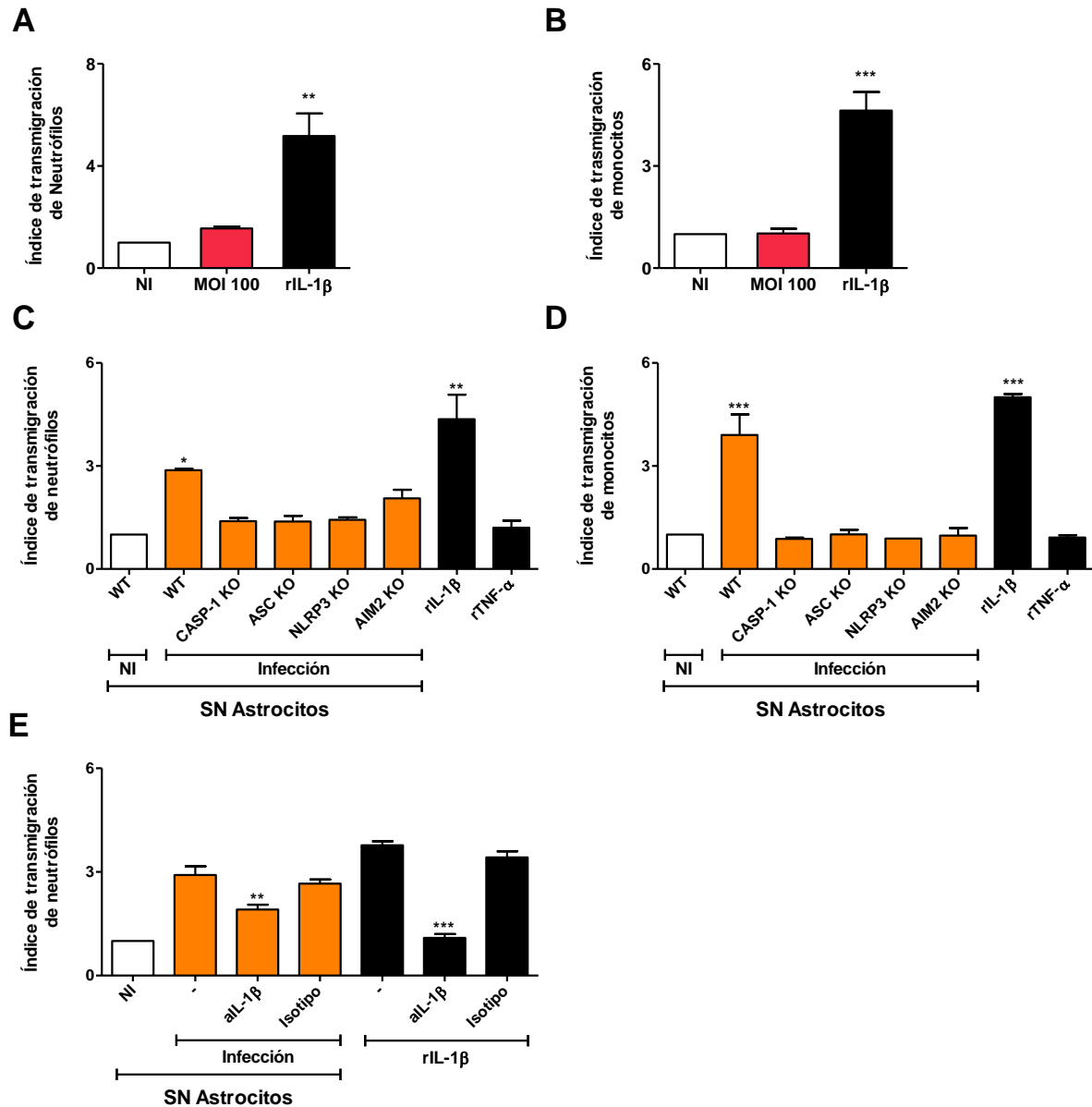
Posteriormente utilizamos estos sobrenadantes para estimular a las HBMEC y evaluar los parámetros de activación. La activación de las HBMEC fue inducida por el sobrenadante de infección de células gliales provenientes de ratones WT, TLR4 y TLR6 KO. En contraposición el sobrenadante de infección de células gliales provenientes de ratones KO para Mal/TIRAP o TLR2 no indujo ni la secreción de hIL-6, hIL-8 y hMCP-1 por las HBMEC, ni la expresión de CD54 en las células (Figura 15). Colectivamente, estos resultados indican que la secreción de IL-1 $\beta$  por las células gliales, mediada por el inflamasoma, y la posterior activación de las HBMEC dependen de la señalización a través de TLR2 y Mal/TIRAP. Estos resultados corroboran el rol clave de TLR2 en las respuestas inflamatorias desencadenadas por *B. abortus* descrito por nuestro grupo de trabajo en diferentes tipos celulares [66, 80, 122, 253].



**Figura 15. TLR2 determina la producción de IL-1 $\beta$  por las células gliales, en respuesta a la infección con *B. abortus*, con la consecuente activación de las HBMEC.** Las HBMEC fueron estimuladas por 24 hs con sobrenadantes de astrocytes (SN astrocytes) y microglía (SN microglía) provenientes de ratones WT o ratones KO en Mal/TIRAP (Mal), TLR2, TLR4 y TLR6, infectados (I) o no (NI) con *B. abortus*. Se analizó la secreción de hIL-6 (A), hIL-8 (B), hMCP-1 (C) por las HBMEC mediante ELISA y la expresión de hCD54 en las HBMEC por citometría de flujo (D), expresando los resultados, en este caso, como intensidad de fluorescencia media (IFM). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a la estimulación con el sobrenadante proveniente de ratones WT e infectados con la bacteria. NE: no estimuladas. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

***La activación de las HBMEC por células gliales infectadas con B. abortus promueve la migración transendotelial de neutrófilos y monocitos.***

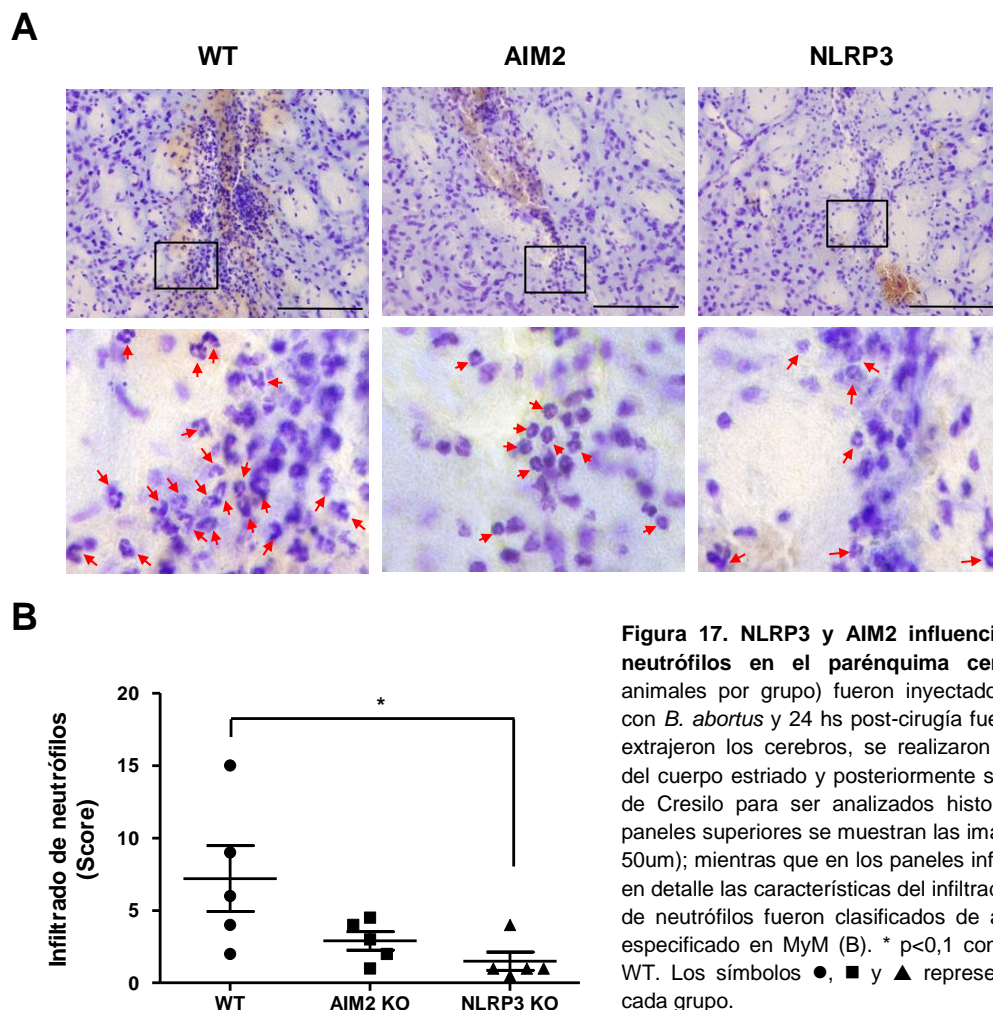
La activación inducida en las HBMEC, en respuesta a la estimulación por células gliales infectadas con *B. abortus*, podría ser la causa del infiltrado inflamatorio descrito en el SNC durante la neurobrucelosis [43, 152]. Para evaluar esta posibilidad, desarrollamos un modelo funcional *in vitro*. En el mismo se cuantificó la transmigración de neutrófilos y monocitos a través de una monocapa de HBMEC establecida en el sistema de "transwell insert". Se analizó también, cuál era el efecto del sobrenadante de infección de células gliales sobre las HBMEC cultivadas en este sistema de "transwell insert" con el fin de investigar el rol de la activación de las HBMEC y su funcionalidad en la transmigración de neutrófilos y monocitos. En primer medida, pudimos observar que la infección de las HBMEC cultivadas en este sistema de "transwell insert", no induce la transmigración de neutrófilos y monocitos (Figura 16A y 16B). En contraposición, la estimulación de la monocapa de HBMEC con sobrenadante de infección de astrocitos aumentó significativamente la transmigración tanto de neutrófilos como de monocitos en comparación con la monocapa de HBMEC tratada con el sobrenadante de células gliales no infectadas. Estos resultados concuerdan con la menor activación de las HBMEC en respuesta a la infección con *B. abortus* en comparación con la activación inducida en las HBMEC por la estimulación con los sobrenadantes de las células gliales infectadas (Figura 6). Cabe destacar que la estimulación con la citoquina recombinante IL-1 $\beta$  indujo la transmigración de ambos tipos celulares, mientras que la estimulación con la citoquina recombinante TNF- $\alpha$  o con sobrenadantes de infección de astrocitos provenientes de ratones KO para CASP-1, ASC, NLRP3 y AIM2 no lo hizo (Figura 16C-D). Confirmando el rol de IL-1 $\beta$  en la activación de las HBMEC y la transmigración de células inmunes a través de la monocapa activada, la neutralización de IL-1 $\beta$  inhibió la transmigración inducida por la estimulación con el sobrenadante de astrocitos infectados con *B. abortus* o por la citoquina recombinante IL-1 $\beta$  (Figura 16E). Estos resultados indican que la activación de la microvasculatura por células gliales infectadas con *B. abortus*, podría ser la causa de la transmigración de células inmunes, por encima de un valor fisiológico, a través de la barrera hematoencefálica observada en la neurobrucelosis, y que la citoquina IL-1 $\beta$  media este efecto.



**Figura 16. HBMEC activadas por células gliales promueven la migración transendotelial de neutrófilos y monocitos humanos.** HBMEC fueron establecidas como monocapa en un sistema de "traswell insert" e infectadas con *B. abortus* a MOI 100 (A y B) o estimuladas con sobrenadante de infección de astrocitos provenientes de ratones WT o KO en CASP-1, ASC, NLRP3 o AIM2 (C y D). Adicionalmente, el sobrenadante de astrocitos WT infectados con *B. abortus* fue pretratado con un Ac neutralizante anti-IL-1 $\beta$ . Luego, se adicionaron neutrófilos (A, C y E) o monocitos (B y D) al compartimento superior y al cabo de 3 hs se cuantificó la trans migración de células en el compartimento inferior. El índice de células que transmigraron en respuesta a la infección se determinó en comparación con la trans migración a través de la monocapa no infectada (NI) (A y B) y el índice de células que transmigraron en presencia de sobrenadante de infección de astrocitos se determinó con respecto a la estimulación de la monocapa con sobrenadante de astrocitos WT no infectados (NI) (C-D). Las citoquinas recombinantes, rIL-1 $\beta$  y rTNF- $\alpha$ , fueron utilizadas como controles. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  con respecto a los correspondientes controles. Las barras representan duplicados experimentales. Se muestra un experimento representativo de tres realizados.

### **Los inflammasomas NLRP3 y AIM2 influncian el infiltrado de neutrófilos al parénquima cerebral en presencia de *B. abortus* in vivo.**

Finalmente, investigamos si la producción de IL-1 $\beta$  dependiente del inflammasoma influenciaba la migración de células inmunes hacia el SNC en un modelo *in vivo*. Para ello, se inyectó *B. abortus* en el cuerpo estriado de ratones WT y KO para NLRP3 y AIM2 y, 24 hs post-cirugía, los animales fueron sacrificados. Se extrajeron los cerebros y se analizaron por microscopia las secciones del estriado, previamente teñidas con violeta de Cresilo. En las secciones de cuerpo estriado de ratones WT inyectados con *B. abortus* se observó la presencia de un extenso y ampliamente diseminado infiltrado inflamatorio, compuesto principalmente de células PMN. En contraposición, se observó una marcada reducción del infiltrado neutrofílico en las secciones de estriado provenientes de ratones NLRP3 y AIM2, siendo significativa solo en los ratones NLRP3 KO ( $p<0,1$ ) (Figura 17). Cabe destacar que no se observaron infiltrados neutrofílicos en las secciones de los hemisferios contralaterales inyectados con solución salina (no mostrados).



**Figura 17. NLRP3 y AIM2 influncian el infiltrado de neutrófilos en el parénquima cerebral.** Ratones (5 animales por grupo) fueron inyectados intracranalmente con *B. abortus* y 24 hs post-cirugía fueron sacrificados. Se extrajeron los cerebros, se realizaron múltiples secciones del cuerpo estriado y posteriormente se tiñeron con violeta de Cresilo para ser analizados histológicamente. En los paneles superiores se muestran las imágenes (40X, escala: 50 $\mu$ m); mientras que en los paneles inferiores se puede ver en detalle las características del infiltrado (A). Los infiltrados de neutrófilos fueron clasificados de acuerdo a un índice especificado en MyM (B). \*  $p<0,1$  con respecto a ratones WT. Los símbolos ●, ■ y ▲ representan los ratones de cada grupo.



## Discusión

La integridad del SNC es resguardada principalmente a través del sistema inmune innato, interviniendo la inmunidad adaptativa solamente bajo ciertas circunstancias [172]. Paradójicamente, la misma activación de la inmunidad innata puede causar efectos nocivos en la neuronas, las células de la glía y la microvasculatura endotelial cerebral [43, 172, 200, 249, 254].

Consideramos que la inflamación es un factor clave en la patogénesis de la neurobrucelosis [247, 248]. Al invadir el SNC, *Brucella* desencadena una respuesta inflamatoria luego de interaccionar con astrocitos y microglía [43] que podría contribuir a la activación del endotelio cerebral. Los astrocitos son la población celular más abundante del SNC [175, 176]. Se encuentran rodeando al endotelio cerebral y su interacción con las células endoteliales determina la función y el fenotipo de la BHE [183, 184]. Si bien la microglía, los macrófagos residentes del SNC, no participan directamente en el mantenimiento del fenotipo de la BHE, juegan un rol clave en el mantenimiento de su homeostasis [190]. Es por eso, que tanto los astrocitos como la microglía se encuentran en una posición crítica para influenciar la activación de la microvasculatura cerebral y la integridad de la BHE una vez que *Brucella* alcanza el parénquima cerebral. La tríada de citoquinas inflamatorias, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6, secretadas luego de la activación de la inmunidad innata, es importante para la activación del endotelio cerebral [172, 244] y la pérdida de la integridad del mismo [245, 246]. Nuestros resultados indican que la activación de las HBMEC mediada por *B. abortus* fue inducida por sobrenadantes de cultivo que contienen estas citoquinas [43], señalando a estos mediadores como potenciales efectores de la activación de las HBMEC inducida por células gliales frente a la infección con *B. abortus*. Nuestro grupo reportó un rol crítico de TNF- $\alpha$  e IL-6 en la inmunopatogénesis de la brucelosis [223, 253, 255, 256] inclusive en su manifestación neurológica [43]; pero hasta el momento no había sido investigado el rol de IL-1 $\beta$  en la patogénesis de la neurobrucelosis. Nuestros resultados demuestran que IL-1  $\beta$ , y no TNF- $\alpha$ , es la citoquina efectora involucrada en la activación de las HBMEC por las células gliales infectadas con *B. abortus*.

Si bien está descripto que tanto IL-1 $\beta$  como TNF- $\alpha$  están implicadas en la activación de la BHE [244], al menos en nuestro modelo TNF- $\alpha$  no se está involucrado en la activación de las células endoteliales; de igual manera como se muestra en un modelo murino de encefalitis por *Toxoplasma* [257]. La razón de las discrepancias observadas, en cuanto a la implicancia o no del TNF- $\alpha$ , se desconoce pero podría relacionarse con las concentraciones empleadas para inducir la activación en los experimentos en los cuales vinculan a TNF- $\alpha$

como el principal mediador responsable de la activación endotelial [200-202], que son al menos 2 órdenes de magnitud mayor a las concentraciones encontradas en el sobrenadante de células gliales infectadas con *B. abortus* en esta tesis y en trabajos previos [43].

Los inflammasomas han emergido como moléculas de señalización de la inmunidad innata en el SNC y la función de los NLRs ha sido descrita recientemente en procesos neuroinflamatorios [194]. En este trabajo, investigamos la implicancia de los inflammasomas y el mecanismo dependiente de CASP-1 en la secreción de IL-1 $\beta$  por las células gliales infectadas con *Brucella* que lleva a la activación de las HBMEC. Nuestros resultados demuestran que los inflammasomas dependientes de la molécula adaptadora ASC son indispensables para inducir la activación de CASP-1 y la consecuente maduración y secreción de IL-1 $\beta$  luego de la infección de astrocitos y microglía con *B. abortus*. Más aún, los resultados indican que la secreción de IL-1 $\beta$ , por las células gliales infectadas con la bacteria, depende específicamente de los inflammasomas NLRP3 y AIM2, confirmando y extendiendo el trabajo de Gomez *et al.* [99], resaltando el rol de los inflammasomas dependientes de ASC, no solo en el reconocimiento y la defensa contra *B. abortus* [99] sino también en la inmunopatología de la neurobrucelosis. Los experimentos de bloqueo empleando un Ac neutralizante para IL-1 $\beta$  corroboran que esta citoquina es el principal mediador responsable de la activación de las HBMEC. En contraposición, la estimulación de las HBMEC con la citoquina recombinante IL-18, otra de las citoquinas secretadas por acción de los inflammasomas que está relacionada a la progresión de una respuesta de tipo Th1 favorable para la resolución de la infección por *Brucella* [250] no indujo la activación de las mismas. Por su parte, si bien se describió que la secreción de IL-33 se restringe a células endoteliales y astrocitos; e incluso en esta última población celular, aumenta en respuesta a LPS, se ha demostrado que las células endoteliales carecen de receptor para esta citoquina [251]. Motivo por el cual prescindimos de evaluar el efecto de IL-33 en la activación de las HBMEC.

La secreción de IL-1 $\beta$  requiere de dos señales. La primer señal puede ser desencadenada por PAMPs vía activación de un TLR, que induce la síntesis de pro-IL-1 $\beta$ . La segunda señal la provee la activación del inflammasoma y CASP-1 conduciendo al procesamiento de pro-IL-1 $\beta$  en su forma madura y secretable. Utilizando células gliales provenientes de ratones KO pudimos dilucidar que la producción de IL-1 $\beta$  en las células gliales depende de la presencia de la molécula adaptadora Mal/TIRAP (Mal) que se encuentra río abajo y compartida entre distintas vías de señalización que se originan a partir de TLR1, TLR2, TLR4 y TLR6 [258]. Además, demostramos que el fenómeno no es dependiente de TLR4 ni TLR6 sino dependiente de TLR2. Estos resultados son congruentes

con resultados previos de nuestro laboratorio en los cuales se demuestra que la señalización vía TLR2/MyD88 es crucial para la respuesta inflamatoria frente a *B. abortus* [253]. Colectivamente, toda esta información sugiere, aunque no prueba formalmente, que las lipoproteínas de *Brucella* serían los ligandos que desencadenan la primera señal dependiente de TLR2 en la activación del inflamasoma y la consecuente secreción de IL-1 $\beta$  responsable de la activación de las HBMEC. Con respecto a la segunda señal, se ha demostrado recientemente que el ADN de *Brucella* está involucrado en la activación de CASP-1 como consecuencia de la activación del inflamasoma AIM2, mientras que la activación del inflamasoma NLRP3 depende de especies reactivas del oxígeno inducidas por *Brucella* [99]. Desconocemos porque la delección de NLRP3 o AIM2 individualmente resulta en la inhibición completa de IL-1 $\beta$  en respuesta a la infección. Sin embargo, esto podría implicar que frente a ciertas infecciones bacterianas, NLRP3 y AIM2 podrían formar parte del mismo complejo multiproteico en el inflamasoma. Alternativamente, durante la infección de células gliales con *B. abortus*, NLRP3 y AIM2 podrían ser mutuamente requeridas para inducir la transformación catalítica hacia la molécula bioactiva IL-1 $\beta$ .

Basándonos en el conocimiento adquirido frente a otras infecciones bacterianas [200, 259], se puede especular que la activación de la microvasculatura cerebral en respuesta a la infección con *Brucella*, la consecuente sobreexpresión de moléculas de adhesión y la secreción de citoquinas proinflamatorias y quemoquinas, serían factores importantes en la disfuncionalidad de la barrera hematoencefálica que se observa tanto en pacientes cursando neurobrucelosis [152, 162, 233] como en modelos animales [43]. Aunque estos mediadores proinflamatorios podrían hipotéticamente jugar un rol en la defensa contra *B. abortus* de manera directa o indirecta, también podrían ser claves en la regulación de la activación e integridad de la BHE. Esta especulación pudo ser confirmada tanto *in vitro* como *in vivo*, evaluando la trans migración de células inmunes. Una característica definitoria de la respuesta inflamatoria en SNC inducida por citoquinas es la desestabilización de la BHE que conlleva a un aumento de la permeabilidad vascular. Las células endoteliales de la BHE expresan bajo niveles de moléculas de adhesión que podrían ser utilizadas por los leucocitos para la migración transendotelial en condiciones fisiológicas. Luego de la estimulación inflamatoria se induce en las células endoteliales de la microvasculatura la expresión de moléculas de adhesión tales como ICAM, VCAM y selectinas [196] que repercuten en la mayor trans migración de leucocitos. Además las citoquinas proinflamatorias incluyendo TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e IL-1 $\beta$  han sido descriptas como mediadores responsables en el aumento de la expresión de ICAM-1 [260]. Más aun, la secreción de IL-1 $\beta$  reveló tener un rol fundamental a la hora de modular la permeabilidad física de la BHE y aumentar el infiltrado

de células inmunes hacia el SNC [198]. Nuestros resultados demuestran que la activación de las HBMEC por células gliales infectadas con *B. abortus*, pero no la infección en sí, se correlaciona con un aumento en la capacidad de promover la trans migración de monocitos y neutrófilos a través de una monocapa desarrollada en un sistema de “*transwells insert*”. Este fenómeno dependió de la secreción de IL-1 $\beta$  por las células gliales, ya que la estimulación de la monocapa con sobrenadantes de astrocitos provenientes de ratones KO para las moléculas CASP-1, ASC, NLRP3 o AIM2, fue incapaz de inducir la migración transendotelial. De la misma manera, cuando se neutralizó el efecto de la citoquina en sobrenadantes de infección de astrocitos WT con un Ac neutralizante anti IL-1 $\beta$ , nuevamente disminuyó la trans migración de células a través de la monocapa. Estos resultados indican que la interacción de *Brucella* con la inmunidad innata *in vivo* podría resultar en un aumento de la trans migración de fagocitos al parénquima cerebral que podría dar sustento a la pleocitosis observada en pacientes con neurobrucelosis [152, 233]. La activación de los inflammasomas en la respuesta inmune innata podría ser responsable de tal trans migración. Apoyando esta especulación, la presencia de *B. abortus* en el parénquima cerebral de ratones WT indujo un infiltrado neutrofílico que fue reducido en ratones KO para NLRP3 y AIM2 demostrando, una vez más la importancia de IL-1 $\beta$  en la activación de las HBMEC y su rol fundamental en el desarrollo de la patología.

## CAPITULO III

*‘B. abortus induce la secreción de MMPs por astrocitos a través de la secreción de  $TNF-\alpha$ ’*

## Introducción

Los astrocitos son el tipo celular más numeroso que forma parte del SNC y, como hemos mencionado, poseen diversas funciones. Una de ellas se relaciona al mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular (MEC) en el tejido cerebral. La MEC se encuentra en íntima asociación con las células endoteliales, contribuyendo a la estabilidad de la BHE.

Las metaloproteasas de matriz (MMPs) son una familia de enzimas proteolíticas, cuya estructura está compuesta por tres dominios básicos muy conservados: Un dominio pro-péptido, un dominio catalítico y un dominio de tipo hemopexin. El dominio catalítico es responsable de la actividad proteolítica, depende de la unión de zinc y calcio y puede presentar o no, dominios estructurales y funcionales secundarios que determinan la especificidad de sustrato. De acuerdo a esta especificidad, las MMP pueden clasificarse en: colagenasas (MMP-1, -8 y -13), gelatinasas (MMP-2 y -9), estromelisin (MMP-3, -10 y -11), elastasas (MMP-7 y -12) y MMP de unión a membrana (MT-MMP, MMP-14 a -17) [261].

Debido a su capacidad destructiva, la actividad de las MMPs se encuentra estrictamente regulada en diferentes niveles. Su expresión es controlada a nivel transcripcional por citoquinas, factores de crecimiento y hormonas. Son secretadas como pro-enzimas que requieren ser procesadas para su activación y además, poseen una marcada regulación por parte de inhibidores endógenos, los inhibidores tisulares de metaloproteasas (TIMP), que actúan uniéndose no-covalentemente a las MMP e inhibiendo su actividad [262, 263].

Las MMPs desempeñan muchas funciones en la respuesta inmune frente a patógenos. Están implicadas, principalmente, en el remodelado de la MEC posterior a la eliminación y resolución de focos infecciosos. En los últimos años también fueron asociadas con mecanismos de inmunomodulación, con el infiltrado de leucocitos al sitio de infección y con el procesamiento de citoquinas [264]. Paradójicamente, la actividad de las MMPs es requerida para el correcto desempeño de la respuesta inmune normal pero, por otro lado, puede contribuir a la inmunopatología. Una actividad exacerbada de las MMPs puede inducir la destrucción de tejidos, favoreciendo la diseminación de microorganismos por ruptura de barreras anatómicas y permitiendo el acceso de células inmunes a sitios de inmunoprivilegio como consecuencia de la proteólisis de la membrana basal [265, 266]. Además durante este proceso también se pueden generar DAMPs. Esto va en concordancia con que la MEC no solo tiene un rol estructural, que es preponderante, sino que también tiene un rol fundamental en determinar las respuestas funcionales de las células con respecto a su entorno [267].

En la fisiología normal del SNC, las MMPs participan en el remodelado del parénquima cerebral y cumplen funciones primordiales durante el desarrollo del mismo. Sin embargo, también han sido asociadas al progreso de las respuestas neuroinflamatorias en un rango amplio de patologías del SNC, incluyendo la encefalitis autoinmune experimental, la esclerosis múltiple y la tuberculosis con compromiso del SNC [268-271].

Dentro de las metaloproteasas, MMP-2 y MMP-9 poseen actividad gelatinolítica. En particular, está bien documentada la relación entre la actividad de MMP-9 y la disrupción de la BHE en diversos modelos de neuropatología [272-274]. En infecciones bacterianas, como la generada por *Mycobacterium tuberculosis*, se observó un aumento tanto en la secreción de MMP-2 como de MMP-9 en la línea monocítica THP-1 y en extractos celulares de pulmón. Además se estableció que los niveles de MMPs en LCR se correlacionan con la severidad de la enfermedad, la destrucción tisular localizada en el SNC y el síntoma de déficit neurológico en los pacientes [178, 275, 276].

Debido a que las citoquinas proinflamatorias pueden influenciar la expresión de las MMPs, incrementando la permeabilidad de la BHE por degradación de los componentes de la MEC [277] es que decidimos evaluar cómo la respuesta inflamatoria desencadenada por astrocitos frente a la infección con *B. abortus* podría inducir la secreción de MMPs que afectan la estructura de la MEC.

## Resultados

### ***La infección de astrocitos con *B. abortus* induce la secreción de MMP-9.***

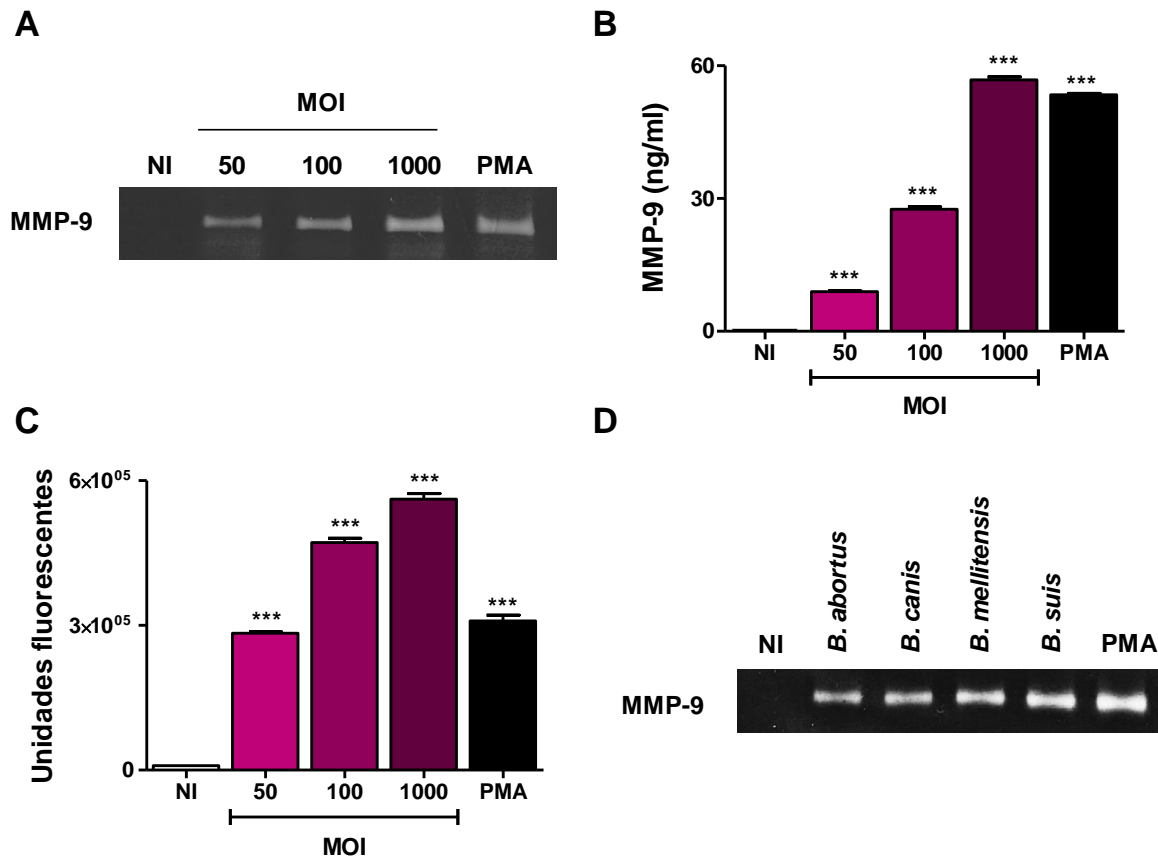
Los astrocitos pueden responder a infecciones bacterianas produciendo un aumento en la secreción de MMPs [278, 279]. Por lo tanto, decidimos estudiar si la infección con *B. abortus* induce la secreción de MMP por los astrocitos. Para llevar a cabo este objetivo, infectamos cultivos primarios de astrocitos BALB/C con *B. abortus* a diferentes MOIs por 48 hs y luego analizamos la secreción de MMPs en el sobrenadante de infección por la técnica de zimografía. Como se puede observar en la Figura 18A, la infección de los astrocitos con *B. abortus* resultó en un aumento de la actividad de MMPs en el sobrenadante de infección que, de acuerdo al peso molecular (92 kDa), correspondería con MMP-9. Estos resultados fueron confirmados y cuantificados por ELISA, utilizando Ac monoclonales específicos para MMP-9. Se observó un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) en los niveles de secreción de MMP-9 en el sobrenadante de los astrocitos infectados con respecto a los niveles de secreción de las células no infectadas (Figura 18B). Para ambos ensayos se utilizó forbol miristato acetato (PMA) como control positivo.

*In vivo*, la actividad de las MMPs es contrarrestada por la actividad de TIMPs, lo que implica que la actividad neta en una muestra compleja, como un sobrenadante de cultivo, depende del balance entre la actividad de las MMPs y de los TIMPs [261]. Durante la corrida electroforética, los complejos MMP-TIMP se disocian por lo tanto que la actividad neta no puede ser evaluada por zimografía. Recurrimos, entonces, a evaluarla en fase fluida utilizando un sustrato de gelatina que se encuentra unida a fluoresceína y que no fluoresce cuando la molécula está íntegra (Ver MyM). Cuando esta gelatina se degrada fluoresce y esta fluorescencia es directamente proporcional a la actividad gelatinolítica neta. Incubamos los sobrenadantes de astrocitos infectados con *B. abortus* con el sustrato de gelatina y determinamos la emisión de fluorescencia producida por los péptidos fluorescentes originados por la digestión de la gelatina. La actividad gelatinolítica neta (medida como intensidad de fluorescencia) aumentó significativamente ( $p < 0,001$ ) en los sobrenadantes de astrocitos infectados con *B. abortus* en comparación con los sobrenadantes provenientes de células no infectadas (Figura 18C). Por todos los métodos empleados, la magnitud de MMP-9 secretada al sobrenadante de cultivo fue directamente proporcional a la MOI utilizada para infectar las células.

La secreción de MMP-9 no fue un atributo único de la infección por *B. abortus* sino que *B. canis*, *B. melitensis* y *B. suis* también fueron capaces de inducir la secreción de



MMP-9 (Figura 18D). En conjunto estos resultados indican que los astrocitos murinos secretan MMP-9 frente a la infección con bacterias del género *Brucella*.



**Figura 18. *Brucella* induce la secreción de MMP-9 por astrocitos.** Cultivos primarios de astrocitos fueron infectados con *B. abortus* a las MOIs indicadas. La secreción de MMP-9 en el sobrenadante de los astrocitos infectados fue evaluada por zimografía (A) y ELISA (B) a 48 hs post-infección. La actividad gelatinolítica neta en los sobrenadantes fue evaluada como emisión de fluorescencia como consecuencia de la degradación de gelatina previamente unida a fluoresceína y expresada como unidades fluorescentes informadas por el fluorómetro (C). La secreción de MMP-9 frente a la infección por distintas especies del género *Brucella* a MOI 100 fue determinada por zimografía a 48 hs post-infección (D). Forbol miristato acetato (PMA) fue utilizado como control positivo. \*\*\*  $p < 0,001$  versus sobrenadante de astrocitos no infectados (NI).

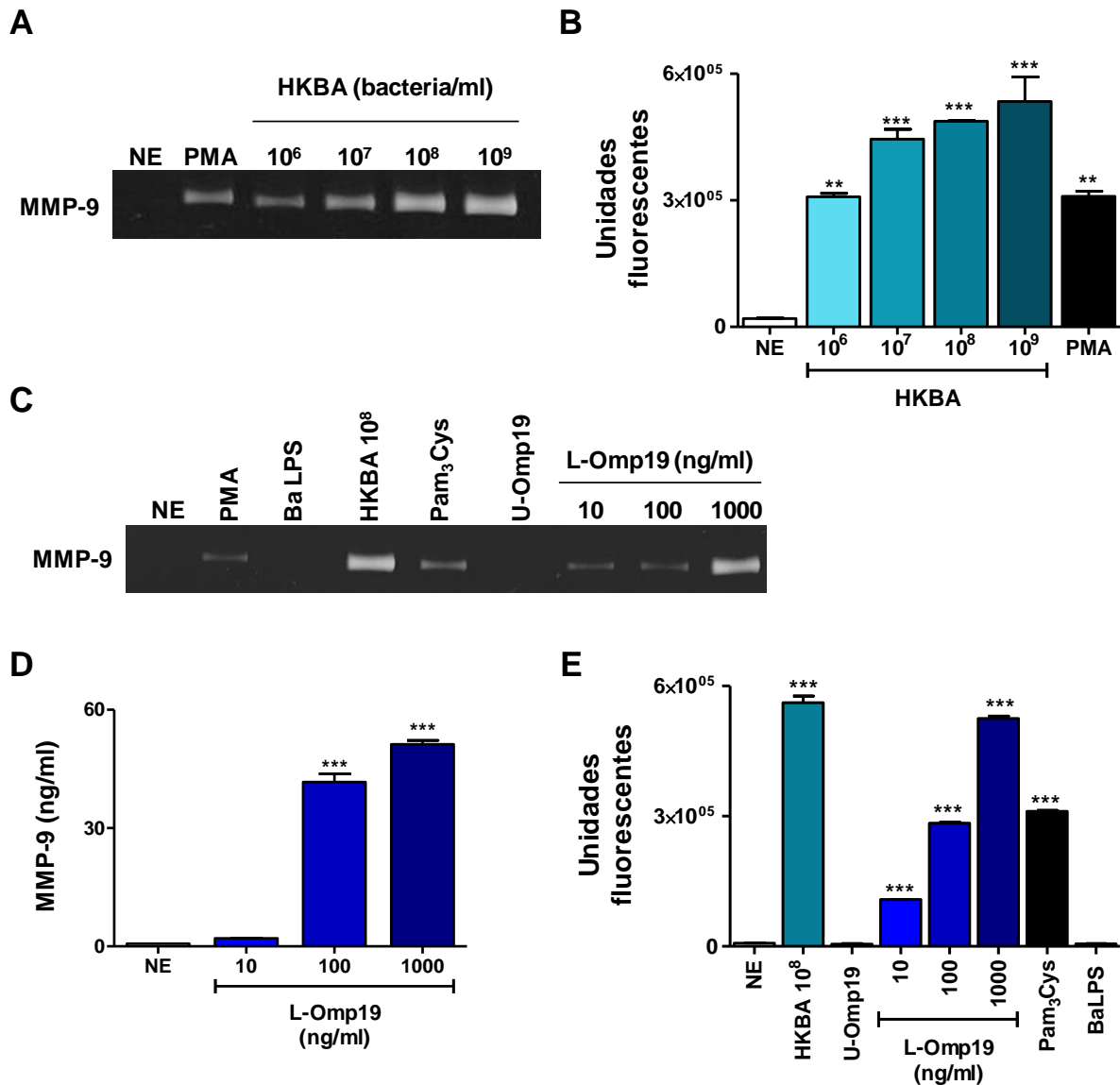
### ***La secreción de MMP-9 por astrocitos infectados con B. abortus está mediada por componentes estructurales de la bacteria.***

Para investigar si la viabilidad de la bacteria era un factor clave en la inducción de MMPs por los astrocitos, se evaluó la habilidad de la bacteria muerta por calor, HKBA (del inglés "*Heat kill Brucella abortus*"), en inducir la secreción de MMP-9 en dichas células. Para ello, estimulamos cultivos primarios de astrocitos con diferentes concentraciones de HKBA por 48 hs. PMA se utilizó como control positivo. La secreción de MMP-9 fue marcadamente aumentada en sobrenadantes de cultivo provenientes de astrocitos estimulados con HKBA en comparación con los sobrenadantes de astrocitos no estimulados, tanto por zimografía

como evaluando la actividad gelatinolítica neta (Figura 19A y 19B). En ambos análisis, la secreción fue dependiente de la cantidad de bacteria utilizada para estimular las células. Un aumento significativo ( $p < 0,001$ ) de la actividad de MMP-9 fue detectada en cultivos estimulados entre  $1 \times 10^6$  y  $1 \times 10^9$  bacterias/ml, concentraciones similares a las empleadas en los cultivos infectados con bacteria viva.

Esta observación sugiere que no es primordial la viabilidad de la bacteria en la secreción de MMP-9 sino, que algún componente estructural de *B. abortus* está mediando este efecto. Dado que nuestro grupo de trabajo demostró, anteriormente, que las lipoproteínas de *B. abortus* inducen la secreción de citoquinas y MMPs en diferentes tipos celulares [43, 280], postulamos que las lipoproteínas de *Brucella* podrían estar vinculadas a la secreción de MMP-9 por los astrocitos. Para investigar esta hipótesis, empleamos como modelo una lipoproteína de membrana recombinante de *B. abortus* denominada Omp19 que fue obtenida en nuestro laboratorio [80]. Los astrocitos fueron incubados con la lipoproteína lipidada (L-Omp19) y el sobrenadante de cultivo fue recolectado a las 48 hs para medir la secreción de MMP-9 por zimografía y ELISA; y evaluar la actividad gelatinolítica neta. L-Omp19 indujo la secreción de MMP-9 de manera dependiente de la concentración de proteína utilizada para estimular a las células ( $p < 0,001$ ). Independientemente del método a través del cual se evaluó la actividad de MMP-9, su inducción fue dependiente de la lipidación de L-Omp19, debido a su versión no lipidada (U-Omp19) no indujo la secreción de MMP-9 (Figura 19C y 19E).

Para establecer si los efectos desencadenados por L-Omp19 podrían extenderse a todas las lipoproteínas de *B. abortus*, la producción de MMP-9 fue evaluada en cultivos de astrocitos estimulados con un lipoheptapéptido sintético ( $\text{Pam}_3\text{Cys}$ ) que mimetiza la porción lipídica de las lipoproteínas [281]. En las Figuras 19C y 19E se observa que  $\text{Pam}_3\text{Cys}$  promueve la secreción de MMP-9 por astrocitos, indicando que la cisteína tripalmitoilada es la estructura molecular de la L-Omp19 responsable de inducir la secreción de MMP-9. Por su parte, el LPS de *B. abortus* no tuvo efecto en la secreción de MMP-9, ni siquiera a una alta concentración (1.000 ng/ml) (Figura 19C y 19E). En conjunto estos resultados, indican que las lipoproteínas de *B. abortus* inducen la secreción de MMP-9 en los astrocitos.

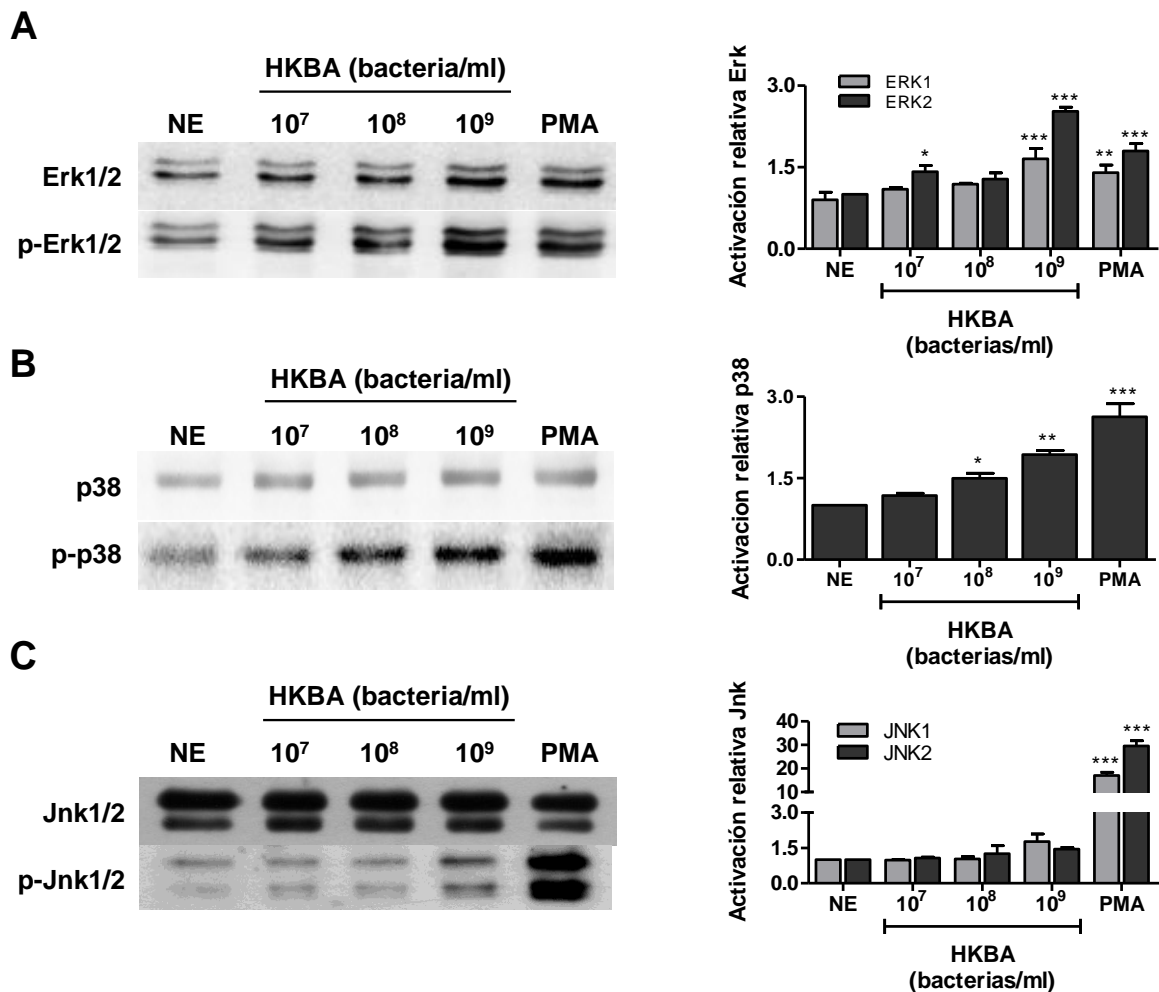


**Figura 19. La secreción de MMP-9 por astrocitos infectados con *B. abortus* está mediada por componentes estructurales de la bacteria.** Cultivos primarios de astrocitos fueron estimulados con HBKA, LPS de *B. abortus* (Ba LPS, 1000 ng/ml), lipoproteína lipidada (L-Omp19) a las concentraciones indicadas o su versión no lipidada (U-Omp19, 1000 ng/ml). La producción de MMP-9 se determinó por zimografía (A y C) y ELISA (D) a 48 hs post-estimulación. También se analizó la emisión de fluorescencia (unidades fluorescentes) como medida de la actividad gelatinolítica neta (B y E). PMA (50 ng/ml) fue utilizado como control positivo y Pam<sub>3</sub>Cys (50 ng/ml) fue utilizado como control positivo de lipidadación. \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001 versus sobrenadante de cultivo de astrocitos no estimulados (NE).

### **HKBA y L-Omp19 inducen la activación de las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK.**

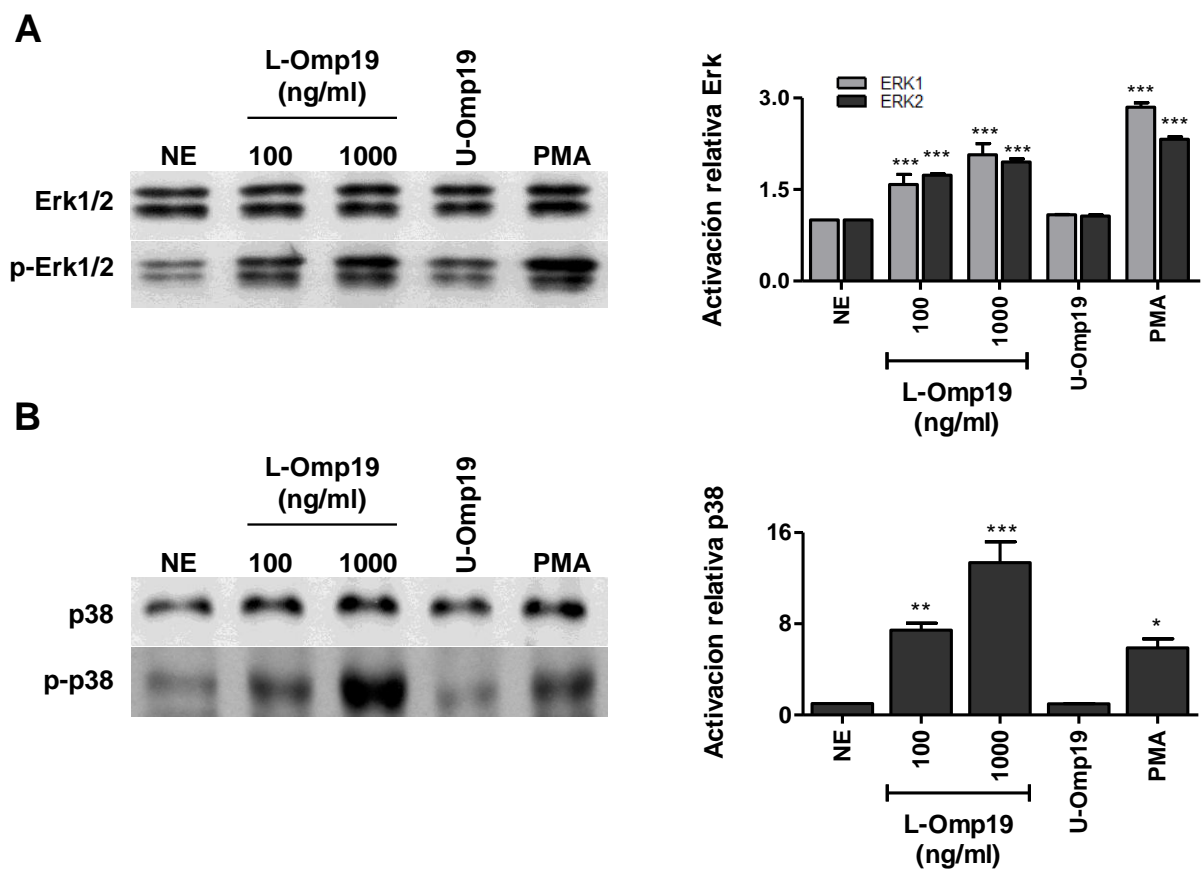
Las vías de las MAP kinasas (MAPK) poseen un rol fundamental en la regulación y expresión de genes responsables de la secreción de citoquinas proinflamatorias [282], del mismo modo que juegan un papel importante en la producción de MMP [180, 283, 284]. Decidimos, entonces, explorar la posibilidad de que las MAPK cumplieran un rol clave como parte del mecanismo a través del cual se induce la secreción de MMP-9 por los astrocitos. Con tal fin, evaluamos en una primera instancia, si HKBA inducía la activación de las vías

Erk1/2, p38 y Jnk1/2 de las MAPK. Para ello, realizamos extractos celulares de cultivos primarios de astrocitos que fueron estimulados con HKBA y luego, evaluamos la fosforilación de cada una de las vías por la técnica de Western Blot con respecto a los astrocitos no estimulados. La estimulación de astrocitos con HKBA indujo la fosforilación de la vía Erk1/2 y p38 de manera dosis dependiente (Figura 20A y 20B). Por el contrario, si bien, se observó una leve fosforilación de Jnk1/2 en los extractos estimulados con la mayor concentración de HKBA ( $1 \times 10^9$  bacterias/ml), esta activación no mostró diferencias significativas (Figura 20C).



**Figura 20. HKBA induce la activación de la vía Erk1/2 y p38 de las MAPK.** Se realizaron extractos celulares de cultivos primarios de astrocitos estimulados con HKBA a las concentraciones indicadas. La activación de las MAPK fue analizada como fosforilación de cada una de las vías por la técnica de Western Blot. Erk1/2 total y fosforilado (p-Erk1/2) (A), p38 total y fosforilado (p-p38) (B) y Jnk1/2 total y fosforilado (p-Jnk1/2) (C). La columna de la izquierda muestra el análisis densitométrico. En el mismo se representa la cuantificación de la activación relativa con respecto a extractos de astrocitos no estimulados (NE). PMA fue utilizado como control positivo de activación. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus extractos de astrocitos no estimulados (NE).

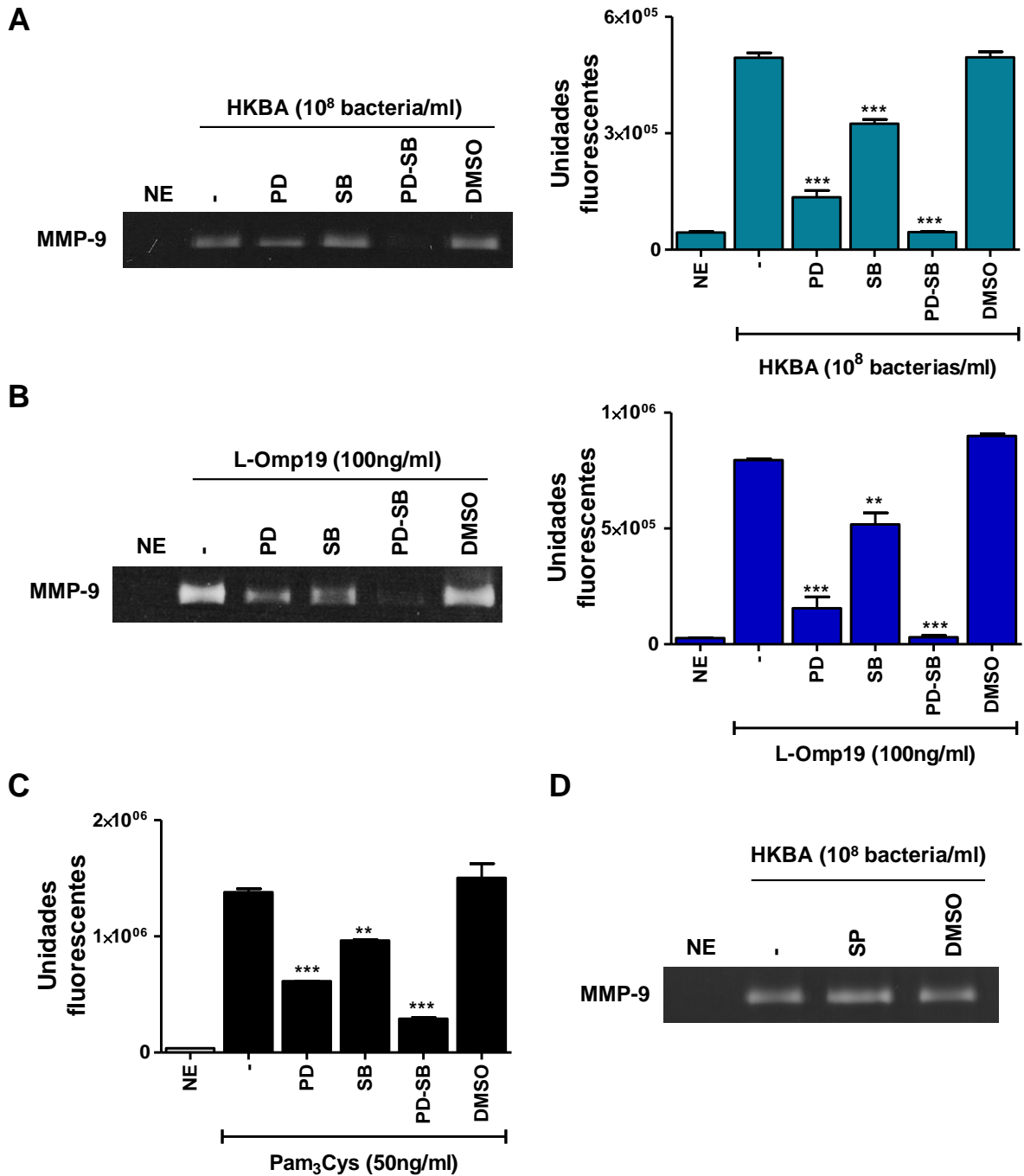
Evaluamos también, la implicancia de L-Omp19 en la activación de las vías que presentaron fosforilación bajo la estimulación con la bacteria muerta. Para ello, obtuvimos extractos de cultivos primarios de astrocitos estimulados con L-Omp19 y U-Omp19. Nuevamente la activación fue evaluada por Western Blot y cuantificada como activación relativa con respecto a extractos de astrocitos no estimulados. Se determinó que la fosforilación de las vías Erk1/2 y p38 depende de la lipidación de la lipoproteína ya que la versión no lipidada de la misma (U-Omp19) no activó ninguna de las dos vías estudiadas (Figura 21). Estos resultados indican en conjunto, que las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK son activadas en cultivos primarios de astrocitos estimulados tanto con HKBA como con L-Omp19, no así la vía de Jnk1/2.



**Figura 21. L-Omp19 induce la activación de la vía Erk1/2 y p38 de las MAPK.** Se realizaron extractos celulares de cultivos primarios de astrocitos estimulados con las concentraciones indicadas de L-Omp19 o con U-Omp19 (1000ng/ml). La activación de las MAPK fue analizada como fosforilación de cada una de las vías por la técnica de Western Blot. Erk1/2 total y fosforilado (p-Erk1/2) (A), p38 total y fosforilado (p-p38) (B). La columna de la izquierda muestra el análisis densitométrico. En el mismo se representa la cuantificación de la activación relativa con respecto a extractos de astrocitos no estimulados (NE). PMA fue utilizado como control positivo de activación. \*  $p < 0,1$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus astrocitos no estimulados (NE).

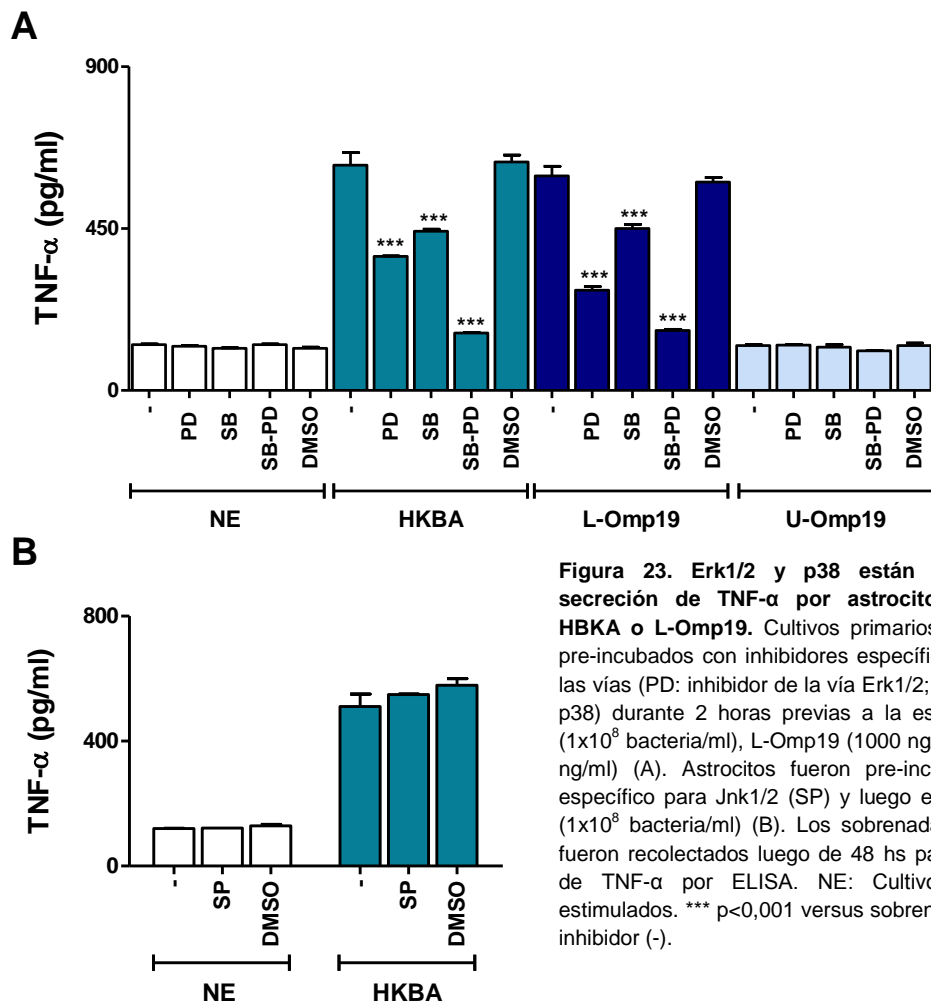
***Las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK están involucradas en la secreción de MMP-9 y TNF- $\alpha$  por astrocitos estimulados con HKBA o L-Omp19.***

A continuación, nos propusimos investigar si la inhibición de las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK podría inhibir la producción de MMP-9. Para ello, evaluamos la funcionalidad de Erk1/2 y p38 utilizando inhibidores específicos de cada una de las vías: PD98059 y SB203580 respectivamente. Los cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con los inhibidores y posteriormente estimulados con HKBA y L-Omp19. Se analizó la secreción de MMP-9 por zimografía y la actividad gelatinolítica en sobrenadantes de astrocitos estimulados con HKBA y L-Omp19 tratados previamente con los inhibidores de las MAPK. La secreción de MMP-9 fue inhibida significativamente ( $p < 0,001$ ) en sobrenadantes tratados con inhibidores para Erk1/2 y p38 individualmente, y completamente suprimida en sobrenadantes tratados con los dos inhibidores conjuntamente (Figura 22A y 22B). Este mismo efecto inhibitorio de la actividad gelatinolítica neta de MMP-9 fue reproducido en sobrenadantes de astrocitos estimulados con Pam<sub>3</sub>Cys (Figura 22C). Como era de esperar, la inhibición de la vía Jnk1/2 con un inhibidor específico de esta vía, SP600125, no tuvo ningún efecto en la secreción de MMP-9 inducida por HKBA (Figura 22D). Estos resultados indican en conjunto, que las vías Erk1/2 y p38 de las MAPK participan en la secreción de MMP-9 en respuesta a la estimulación con HKBA y L-Omp19.



**Figura 22. Erk1/2 y p38 están involucradas en la secreción de MMP-9 por astrocitos estimulados con HBKA o L-Omp19.** Cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con inhibidores específicos para cada una de las vías (PD: inhibidor de la vía Erk1/2; SB: inhibidor de la vía p38) durante 2 horas previas a la estimulación con HBKA ( $1 \times 10^8$  bacteria/ml) (A) y L-Omp19 (1000 ng/ml) (B). Cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con inhibidor específico para Jnk1/2 (SP) y luego estimulados con HBKA ( $10^8$  bacteria/ml) (D). Los sobrenadantes de estimulación fueron recolectados luego de 48 hs para medir la secreción de MMP-9 por zimografía (A, B y D) o analizar la actividad gelatinolítica neta (A, B y C). NE: Cultivos de astrocitos no estimulados. \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$  versus sobrenadante no tratado con inhibidor (-). Pam<sub>3</sub>Cys fue utilizado como control positivo.

Hemos establecido previamente que las lipoproteínas de *Brucella* inducen la secreción de TNF- $\alpha$  por astrocitos [43]. Para determinar si la activación de las vías Erk1/2 y p38, inducidas por la estimulación con HKBA y L-Omp19, repercuten en la secreción de TNF- $\alpha$ , analizamos el efecto de los inhibidores de las MAPK en la producción de esta citoquina. Los cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con los inhibidores y posteriormente estimulados con HKBA, L-Omp19 o U-Omp19. Se midió en los sobrenadantes de la estimulación, la secreción de TNF- $\alpha$  por ELISA. Paralelamente con lo observado para la secreción de MMP-9, la inhibición tanto de Erk1/2 como p38, disminuyó significativamente ( $p < 0,001$ ) la secreción de TNF- $\alpha$  desencadenada por astrocitos frente a la estimulación con HKBA y L-Omp19. Más aún, la inhibición conjunta de las dos vías logró la inhibición completa de la secreción de TNF- $\alpha$  con respecto a los sobrenadantes tratados con los inhibidores individualmente (Figura 23). En contraposición, se corroboró la carencia de funcionalidad de la vía Jnk1/2 en la secreción de TNF- $\alpha$ , ya que el tratamiento con su inhibidor específico, SP600125, no modificó la secreción de la citoquina en estudio (Figura 23B). En conjunto, estos resultados indican que las vías de Erk1/2 como p38, pero no Jnk1/2, estarían implicadas en la respuesta patológica inducida por *B. abortus* y sus lipoproteínas en astrocitos.

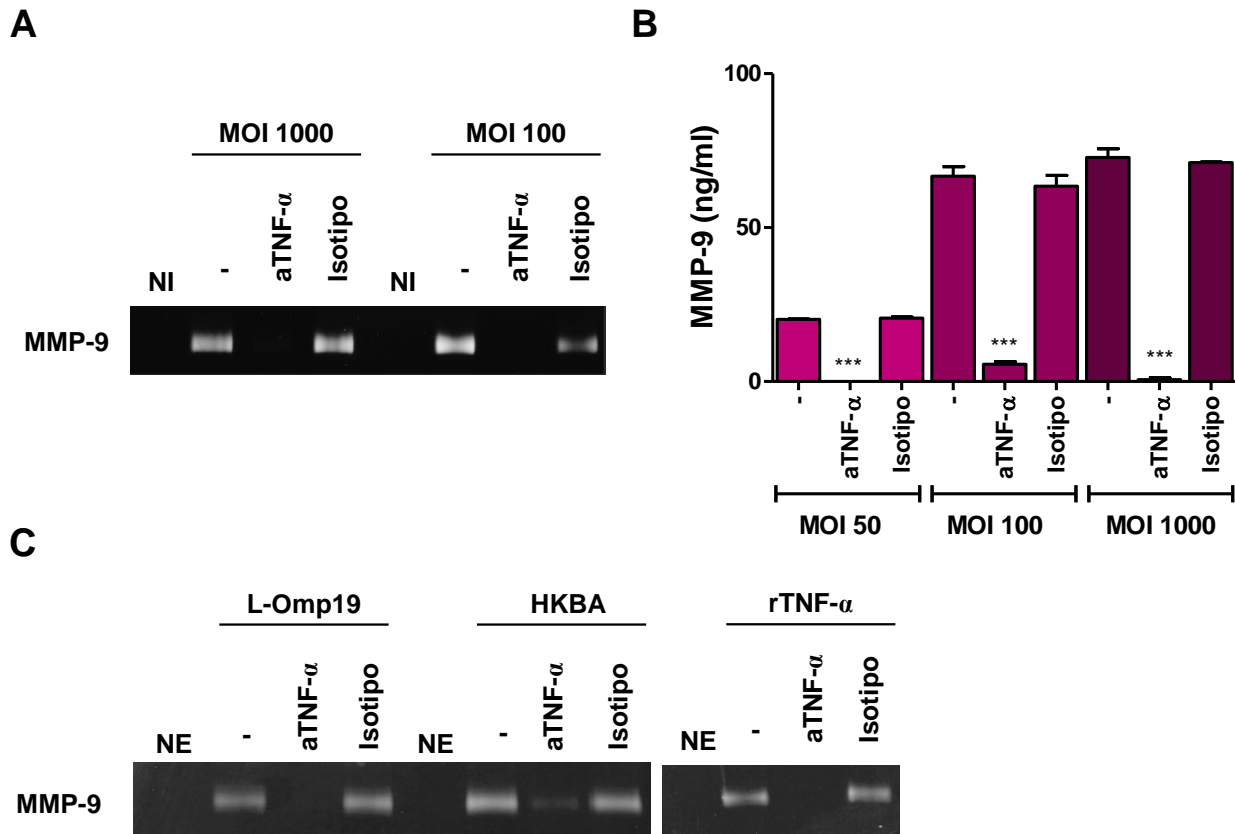


**Figura 23. Erk1/2 y p38 están involucradas en la secreción de TNF- $\alpha$  por astrocitos estimulados con HKBA o L-Omp19.** Cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con inhibidores específicos para cada una de las vías (PD: inhibidor de la vía Erk1/2; SB: inhibidor de la vía p38) durante 2 horas previas a la estimulación con HKBA ( $1 \times 10^8$  bacteria/ml), L-Omp19 (1000 ng/ml) y U-Omp19 (1000 ng/ml) (A). Astrocitos fueron pre-incubados con inhibidor específico para Jnk1/2 (SP) y luego estimulados con HKBA ( $1 \times 10^8$  bacteria/ml) (B). Los sobrenadantes de estimulación fueron recolectados luego de 48 hs para medir la secreción de TNF- $\alpha$  por ELISA. NE: Cultivos de astrocitos no estimulados. \*\*\*  $p < 0,001$  versus sobrenadante no tratado con inhibidor (-).



***TNF- $\alpha$  es la citoquina responsable de la secreción de MMP-9 por astrocitos murinos.***

Considerando la inhibición producida en la producción de MMP-9 y TNF-  $\alpha$  al inhibir las vías de Erk1/2 y p38 y la implicancia de TNF- $\alpha$  como mediador responsable de la producción de MMP-9 en otros tipos celulares [203, 204], incluso frente a la infección con *B. abortus* en otros tipos celulares, [280] es que nos propusimos investigar el rol de esta citoquina en la secreción de MMP-9. Para llevar a cabo estos estudios, los cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con un Ac neutralizante anti-TNF- $\alpha$  o su control de isotipo y luego infectados con *B. abortus*. Nuevamente, la secreción de MMP-9 fue evaluada en los sobrenadantes de la infección por zimografía y ELISA. La neutralización de TNF- $\alpha$  inhibió totalmente ( $p < 0,001$ ) la secreción de MMP-9 a las diferentes MOI estudiadas, mientras que el control de isotipo no tuvo ningún efecto en la respuesta investigada (Figura 24A y 24B). El Ac neutralizante también inhibió significativamente la secreción de MMP-9 producida por HKBA y por L-Omp19 (Figura 24C), mientras que el control de isotipo no tuvo ningún efecto. Como era de esperar, la neutralización de TNF- $\alpha$  bloqueó la secreción de MMP-9 mediada por la citoquina recombinante de TNF- $\alpha$ , corroborando la funcionalidad del Ac neutralizante (Figura 24C). Estos resultados indican que la secreción de MMP-9 desencadenada por *B. abortus* o sus lipoproteínas depende de TNF- $\alpha$ .



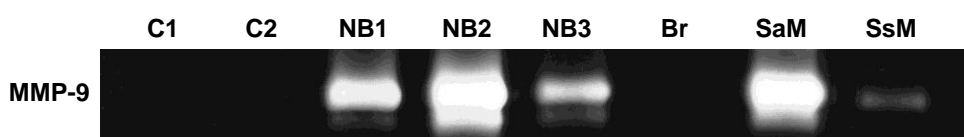
**Figura 24. TNF-α es la citoquina responsable de la secreción de MMP-9 por astrocitos murinos.** Cultivos primarios de astrocitos fueron pre-incubados con un Ac neutralizante de TNF-α (aTNF-α) o su control de isotipo (Isotipo) previo a la infección con *B. abortus* a las MOIs indicadas o a la estimulación con HKBA ( $1 \times 10^8$  bacterias/ml) y L-Omp19 (1000 ng/ml). La estimulación con la citoquina recombinante (rTNF-α) a una concentración de 5 ng/ml fue utilizada como control. Se recolectaron los sobrenadantes de cultivo luego de 48 hs post-infección para analizar la secreción de MMP-9 por zimografía (A y C) y ELISA (B). NI: No infectado. NE: No estimulados. \*\*\* $p < 0,001$  versus sobrenadante no tratado (-).

### ***Pacientes con Neurobrucelosis muestran actividad de MMP-9 en líquido cefalorraquídeo (LCR).***

Hasta aquí, pudimos dilucidar el rol central de la citoquina TNF-α y su implicancia en la secreción de MMP-9 *in vitro*. Proponemos que *B. abortus* accede a SNC y causa un proceso inflamatorio y que esta respuesta inflamatoria podría generar daño tisular, al menos, debido a la secreción de MMPs. Para corroborar esta hipótesis y conocer la posible relevancia clínica de los hallazgos demostrados *in vitro*, decidimos investigar si los pacientes con neurobrucelosis exhibían actividad de MMP-9 en el LCR por la técnica de zimografía. No se observó actividad de MMP-9 en las muestras de LCR provenientes de individuos controles no infectados. En contraposición, detectamos actividad de MMP-9 por la técnica de zimografía en las tres muestras de pacientes con diagnóstico de neurobrucelosis (Figura 25A). Estos pacientes tenían un proceso infeccioso activo localizado en SNC, ya que en los

tres casos se logró el aislamiento de la bacteria por cultivo del LCR, además de exhibir altos títulos de anticuerpos específicos para LPS de *Brucella* y proteínas citoplasmáticas en el mismo (CP) [233] (Figura 25B). Interesantemente, no se detectó actividad de MMP-9 en el LCR del paciente que padece brucelosis sin implicancia neurológica (Figura 25A). Este individuo no presentó Ac anti-*Brucella* en su LCR, ni tampoco se logró el aislamiento bacteriológico (Figura 25B). Esto sugiere, que en la patología humana sólo se secreta MMP-9 al LCR cuando la bacteria invade el SNC. Pacientes que cursan con meningitis causada por invasión con otros patógenos distintos de *Brucella*, también exhiben actividad de MMP-9 en LCR (Figura 25A). En conjunto estos resultados indican que la secreción de MMP-9 por astrocitos en respuesta a *B. abortus* o sus lipoproteínas estaría implicada en la manifestación patológica de la neurobrucelosis.

A



B

Paciente	LCR		Suero		Cultivo de LCR
	aLPS	aCP	aLPS	aCP	
C1	-	-	-	-	Negativo
C2	-	-	-	-	Negativo
NB1	3200	800	6400	3200	Positivo
NB2	1600	800	3200	800	Positivo
NB3	3200	400	6400	3200	Positivo
Br	-	-	800	200	Negativo
SaM	-	-	-	-	ND
SsM	-	-	-	-	ND

**Figura 25. Pacientes con Neurobrucelosis muestran actividad de MMP-9 en LCR.** Se obtuvieron muestras de LCR y suero de pacientes no infectados utilizados como controles negativos (C1 y C2), pacientes con diagnóstico de neurobrucelosis (NB1, NB2 y NB3), pacientes con brucelosis sin implicancias neurológicas (Br) y pacientes con meningitis debida a infección con *Staphylococcus aureus* (SaM) y *Streptococcus spp.* (SsM). En todos los individuos se evaluó la secreción de MMP-9 por zimografía (A). En la tabla (B) se expresan los títulos de Ac contra proteínas citoplasmáticas (aCP) o contra el LPS de *Brucella* (aLPS) en muestras de LCR y suero. El aislamiento de *Brucella* por cultivo bacteriológico se realizó a partir de LCR e informado como LCR positivos o negativos. ND: No determinado.

## Discusión

Conjuntamente con las citoquina inflamatorias, las MMPs cumplen un rol importante en el daño tisular del SNC. Son expresadas en condiciones inflamatorias por diversos tipos celulares, incluyendo leucocitos, células endoteliales y astrocitos. Su capacidad de degradar diversos componentes estructurales, tal como el colágeno que conforma la membrana basal de las células endoteliales, afecta la integridad de la BHE [267, 273, 274, 283, 285]. Varios modelos experimentales de meningitis por neumococos han demostrado que las MMPs contribuyen al daño cerebral y cortical participando en la ruptura de la BHE, en la extravasación de polimorfonucleares y conversión tanto de citoquinas como de sus receptores [276, 286]. Los mismos, relacionan específicamente, la presencia de MMPs con la disfunción de la vasculatura por disrupción de las uniones ocluyentes; promoviendo así, la apertura de la BHE [287]. Más aún, algunos autores no solo han vinculado la secreción de MMPs con la modulación de la integridad de la BHE sino que también mencionan su implicancia en la entrada de células inmunes periféricas hacia el SNC [288-291].

La importancia de la respuesta inflamatoria desencadenada por *B. abortus* en el SNC reside en el posible daño que puede causarle al tejido nervioso [155]. Si bien, los astrocitos cumplen funciones primordiales en la homeostasis del parénquima cerebral, la activación de estas células, como ocurre en la neurobrucelosis, puede aportar a la progresión y desarrollo de la neuropatología. Nuestro grupo de investigación demostró el rol central de los astrocitos en la producción de citoquinas proinflamatorias frente a la infección con *B. abortus* [43], pero se desconocía su contribución como fuente de MMPs en la neurobrucelosis.

Nuestros resultados demuestran que la infección de astrocitos con bacterias del género *Brucella* induce la secreción de MMP-9 al sobrenadante de cultivo, evidenciada por zimografía y ELISA. Con respecto a la actividad de las MMPs, la misma está regulada por la acción de inhibidores tisulares de MMP (TIMP), lo que implica que la actividad neta depende del balance entre la actividad de las MMPs y de las TIMP [261]. A diferencia de la zimografía, la técnica en fase fluida logró evidenciar la actividad gelatinolítica neta en condiciones nativas, donde los complejos MMP-TIMP se encuentran unidos. Utilizando un sustrato de gelatina DQ, que se encuentra unida a fluoresceína, pudimos determinar que los sobrenadantes de astrocitos infectados con *B. abortus* producen la emisión de fluorescencia producida por la digestión de la gelatina lo que indica la presencia de actividad gelatinolítica neta en dichos sobrenadantes. Estos resultados sugieren que la inducción de MMP-9 por astrocitos infectados con la bacteria podría contribuir a la degradación de colágeno en el parénquima cerebral. MMP-2, otra de las metaloproteasas con actividad gelatinolítica, también ha sido implicada en neuropatologías asociada con la disrupción de la barrera

hematoencefálica [292]. Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, la infección de astrocitos por *B. abortus* no indujo alteraciones en la secreción de esta MMP (datos no mostrados).

La producción de MMP-9 no requiere de la viabilidad bacteriana, dado que también se induce por la estimulación con HKBA, sugiriendo que existe algún componente estructural de la bacteria responsable de este fenómeno. Debido a que está descrito que las lipoproteínas de *B. abortus* pueden desencadenar la producción de mediadores inflamatorios [43] y de MMP-9 por otros tipos celulares [255, 280], postulamos que las lipoproteínas de *B. abortus* podrían ser los componentes estructurales involucrados en la secreción de MMP-9 por astrocitos murinos. Efectivamente, pudimos dilucidar que la lipoproteína, L-Omp19, indujo la secreción de MMP-9 por astrocitos de manera dependiente de la concentración utilizada para estimular. Dado que la proteína no lipidada, U-Omp19, fue incapaz de inducir la secreción de MMP-9, se logró determinar que se requiere de la acilación de la misma para desarrollar su actividad biológica. El lipoheptapéptido sintético (Pam<sub>3</sub>Cys) que mimetiza la porción lipídica de las lipoproteínas fue capaz de inducir la secreción de MMP-9, pudiendo extrapolar la capacidad de inducir la secreción MMP-9 a cualquier lipoproteína que presente este motivo lipídico.

Las vías de Erk1/2 y p38 de las MAPK fueron activadas tanto frente a la infección con *B. abortus* como frente a la estimulación con sus lipoproteínas, mientras que la activación de la vía de Jnk1/2 no se vio alterada. Funcionalmente ambas vías participan en la secreción de MMP-9 y en la producción de TNF- $\alpha$  por acción de la estimulación con HKBA como por L-Omp19 en astrocitos. La secreción de MMP-9 y TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente cuando se inhibieron las vías de Erk1/2 y p38 individualmente y fue completamente inhibida la secreción de MMP-9 y TNF- $\alpha$  cuando se inhibieron ambas vías conjuntamente. Estos resultados indican que los astrocitos murinos requieren tanto de la vía de Erk1/2 como de la vía p38 de las MAPK para inducir la secreción de TNF- $\alpha$  y MMP-9 por L-Omp19. El requerimiento de ambas vías para las respuestas óptimas de TNF- $\alpha$  y MMP-9 en astrocitos ya había sido descrito por Ramesh *et al.* y Arai *et al.* [232, 284] en otros modelos experimentales.

Está descrito, para una variedad de patologías del SNC que presentan daño tisular, que la secreción de MMP-9 depende de la inducción citoquinas proinflamatorias [293]. Si bien tanto IL-1 $\beta$  como TNF- $\alpha$  han sido vinculadas a la secreción de MMPs [283, 294-296], TNF- $\alpha$  ha sido implicada en mayor medida a una regulación autócrina o parácrina de la secreción de MMP-9 y consecuentemente en el daño tisular [203, 204], incluso frente a la infección con *B. abortus* [280]. Dado que TNF- $\alpha$  es una citoquina clave en la neurobrucelosis [43, 247], y considerando que tanto la secreción de MMP-9 como de TNF- $\alpha$  ha sido inhibida en presencia de inhibidores de las MAPK es que decidimos investigamos el rol de esta

citoquina en la producción de MMP-9. Los experimentos de bloqueo empleando un Ac neutralizante para TNF- $\alpha$  indicaron que la secreción de esta citoquina por parte de los astrocitos es necesaria y suficiente para inducir la producción de MMP-9 frente a HKBA o L-Omp19.

Se han reportado altas concentraciones de citoquinas y quemoquinas en pacientes que presentan neurobrucelosis [215], sin aportar información sobre la actividad de las MMPs en el LCR de estos pacientes. Para conocer la relevancia clínica de los hallazgos obtenidos en estudios *in vitro*, analizamos por zimografía la expresión de MMP-9 en el LCR de pacientes con diagnóstico de certeza de neurobrucelosis (NB). Observamos que todas las muestras analizadas fueron positivas para la actividad de MMP-9. Interesantemente, la presencia de MMP-9 en el LCR parece ser una característica distintiva de un proceso infeccioso activo en SNC, dado que pacientes con diagnóstico de brucelosis, pero sin implicancia del SNC, no muestran actividad de MMP-9 en el LCR. Cabe destacar que también se encontró un aumento en la actividad de MMP-9 en muestras de LCR tanto de pacientes con compromiso neurológico causado por otros agentes patológicos diferentes de *Brucella* [197, 271, 297-299] como en modelos animales [291] que promueven inflamación en el parénquima cerebral, similar a la producida durante la neurobrucelosis [155].

Los resultados de nuestro modelo *in vitro*, junto con la presencia de MMP-9, citoquinas y quemoquinas en el LCR de los pacientes cursando neurobrucelosis [215], dan respaldo a nuestra hipótesis de que la respuesta inflamatoria desencadenada frente a *Brucella* en el SNC podría contribuir a la patogénesis de la infección. En esta sección, presentamos evidencia que indica que los astrocitos inducen la secreción de MMP-9 frente a la infección con *B. abortus*. Si bien desconocemos el rol directo de la MMP-9 sobre la integridad de la BHE, la capacidad degradativa que presenta podría repercutir en la estabilidad estructural de la BHE.

## **DISCUSIÓN GENERAL**

La neurobrucelosis es la manifestación focalizada más perjudicial e invalidante de la brucelosis y, si bien es considerada una complicación rara, puede alcanzar una incidencia de hasta el 30%. La sintomatología es diversa abarcando desde dolores de cabeza y vómitos, hasta pérdida de conocimiento y síntomas neuropsiquiátricos [144, 160].

Evidencias clínicas demuestran la existencia de una alteración en la integridad de la BHE durante la neurobrucelosis debido a que los pacientes presentan principalmente procesos inflamatorios que comprometen las meninges, inflamación vascular e infiltrados leucocitarios. La pleocitosis observada histopatologicamente junto con la evidencia directa (aislamiento bacteriano) o indirecta de la bacteria (Ac específicos contra LPS) en LCR son prueba de concepto de que la infección del SNC con *B. abortus* activa la BHE y modifica su integridad [134, 162, 216, 217]. Similarmente, un modelo murino desarrollado en nuestro laboratorio [43] fue capaz de corroborar estas observaciones dando sustento a la hipótesis central de esta tesis.

En el marco del estudio de la inmunopatología inducida por *Brucella* que viene desarrollándose en nuestro grupo de trabajo hace algunos años y, dado que los mecanismos patogénicos implicados en la activación de la BHE causada por *Brucella* no habían sido estudiados a nivel celular y molecular, el presente trabajo se centró en dilucidar el mecanismo por el cual *B. abortus* ingresa a SNC y cómo afecta la activación de la inmunidad innata desencadenada por la bacteria en la integridad de la BHE.

La primera pregunta que se desprende de la evidencia clínica es ¿Cuál es el mecanismo utilizado por la bacteria para ingresar al SNC? Si bien observamos que *B. abortus* tiene la capacidad de infectar, invadir y replicar dentro de las HBMEC, nuestros resultados sobre trans migración bacteriana indican que *B. abortus* sería incapaz de atravesar dichas células utilizando el mecanismo transcelular. Estos resultados plantean el siguiente interrogante: ¿Porqué si *B. abortus* tiene la capacidad de infectar a las HBMEC no es capaz de trans migrar de manera transcelular? Esta dicotomía podría ser comprendida al analizar el ciclo de vida de la bacteria. Diversos autores han demostrado que *B. abortus* tiene la capacidad de evadir la vía endocítica con el fin de establecer un nicho replicativo intracelular [55, 56]. En esta Tesis demostramos que, al igual que en diversas células no fagocíticas [56], *B. abortus* escapa de la vía endocítica en HBMEC y genera un nicho replicativo intracelular.

Es importante considerar que la infección y trans migración bacteriana generalmente ocurre asociada a altos grados de bacteriemia [155, 300, 301]. Si bien, Vitry y col [302] demostraron que, durante la infección, *B. melitensis* puede encontrarse libre en el torrente sanguíneo o asociada a glóbulos rojos, estos mismos autores señalan que con el curso de la infección, la mayoría de las bacterias están asociadas a leucocitos, acordando con el consenso de los investigadores del campo que reseña la naturaleza intracelular de *B.*



*abortus* en su fase sanguínea. Por lo tanto, si pudiera ocurrir *in vivo* la infección de células de la microvasculatura cerebral como hemos demostrado en esta tesis, este fenómeno no sería relevante en la transcitosis de la bacteria al SNC ni en la activación de la BHE, representando, a lo sumo, un nicho de establecimiento en la cronicidad. De hecho, al menos en nuestro modelo *in vitro*, observamos que *B. abortus* no utiliza el mecanismo transcelular sino que atraviesa las HBMEC dentro de un monocito infectado mediante el mecanismo denominado "Caballo de Troya". El ciclo de vida intracelular de *Brucella* fortalecería nuestras observaciones sobre la entrada de *B. abortus* al SNC facilitada a través de leucocitos. Si bien algunas revisiones bibliográficas señalan a este mecanismo como el responsable de la trans migración de *Brucella* hacia el SNC, ninguno de ellos lo demuestra concretamente [208, 239]. Los resultados de esta tesis exponen, por primera vez, el mecanismo a través del cual *Brucella* podría acceder al SNC y generar la patología inflamatoria.

Un hallazgo sumamente interesante y novedoso, aunque preliminar, es la capacidad de la bacteria de poder infectar células de la glía, como los astrocitos, aún cuando su ingreso al SNC sea dentro de un monocito infectado. Aunque preliminares, estos resultados podrían presentar una evidencia experimental a lo postulados por Star y col [56], quienes sugirieron que a partir de las 48 hs de infección las bacterias de este género podrían cooptar la vía autofágica para poder, a partir de su nicho intracelular, infectar células adyacentes.

Sería fundamental la corroboración de todos estos resultados *in vivo*, pero la carencia de modelos murinos sobre patología en neurobrucelosis complican ampliamente esta posibilidad y consecuentemente el progreso en el conocimiento de la patobiología de la neurobrucelosis.

Los resultados ya obtenidos en nuestro grupo de trabajo sumados a los conocimientos derivados de este trabajo muestran que una vez que *B. abortus* accede al SNC induce una respuesta inflamatoria que tiene diversas consecuencias: 1) compromete el bienestar de las células de la glia [43]; 2) altera la sobrevivencia de las neuronas (datos aun no publicados de nuestro grupo) y 3) altera la integridad de la BHE, punto principal de estudio del presente trabajo.

¿Cómo afecta específicamente esta respuesta inmune innata en la integridad de la BHE? Diversos mediadores inflamatorios, secretados por las células de la glia, participan en este proceso: 1) El TNF- $\alpha$  ya había sido descrito por nuestro grupo como la citoquina responsable de inducir apoptosis de los astrocitos [43]. En este trabajo vinculamos la secreción de esta citoquina con la secreción de MMP-9 por parte de los astrocitos. MMP-9 podría ser considerado un mediador responsable de alterar la estructura de la BHE debido a que la secreción de esta enzima proteolítica podría degradar componentes de la MEC y 2) IL-1 $\beta$ . En este trabajo demostramos que, a través del ensamblado de inflamomas, la secreción de esta citoquina tiene un rol fundamental en la activación de las HBMEC.

Promueve la secreción de citoquinas y quemoquinas, y aumenta la expresión de moléculas de adhesión por las HBMEC. La activación producida en las células endoteliales por estos mediadores es mucho mayor que la activación producida por la bacteria directamente, demostrando la gran relevancia que tiene la respuesta inmune desencadenada por *B. abortus* sobre la activación de las HBMEC y la consecuente trans migración de monocitos y neutrófilos. Demostramos *in vitro* que la alteración de la BHE es funcional y también relevante *in vivo* en el modelo murino. Además, la presencia de MMP-9 en el LCR de pacientes con diagnóstico de neurobrucelosis le otorgó a este mediador relevancia clínica.

De manera análoga a la estrategia empleada por los griegos para ingresar a través de la puerta de los Dárdanos a la ciudad fortificada de Troya [303], los resultados presentados en esta Tesis demuestran que *B. abortus* tomaría ventaja del flujo fisiológico de leucocitos hacia el SNC para acceder al parénquima cerebral e infectar células residentes del mismo. La activación producida en las células endoteliales en respuesta a la inmunidad innata desencadenada por las células de la glia (astrocitos y microglía) en respuesta a *B. abortus* reclutaría células inmunes para la resolución del proceso infeccioso, fomentando aun más la trans migración de leucocitos infectados con la bacteria. De esta manera se conformaría un ciclo de retroalimentación proinflamatorio que explicaría la alteración en la integridad de la BHE observada en los pacientes con neurobrucelosis (Ilustración 4).

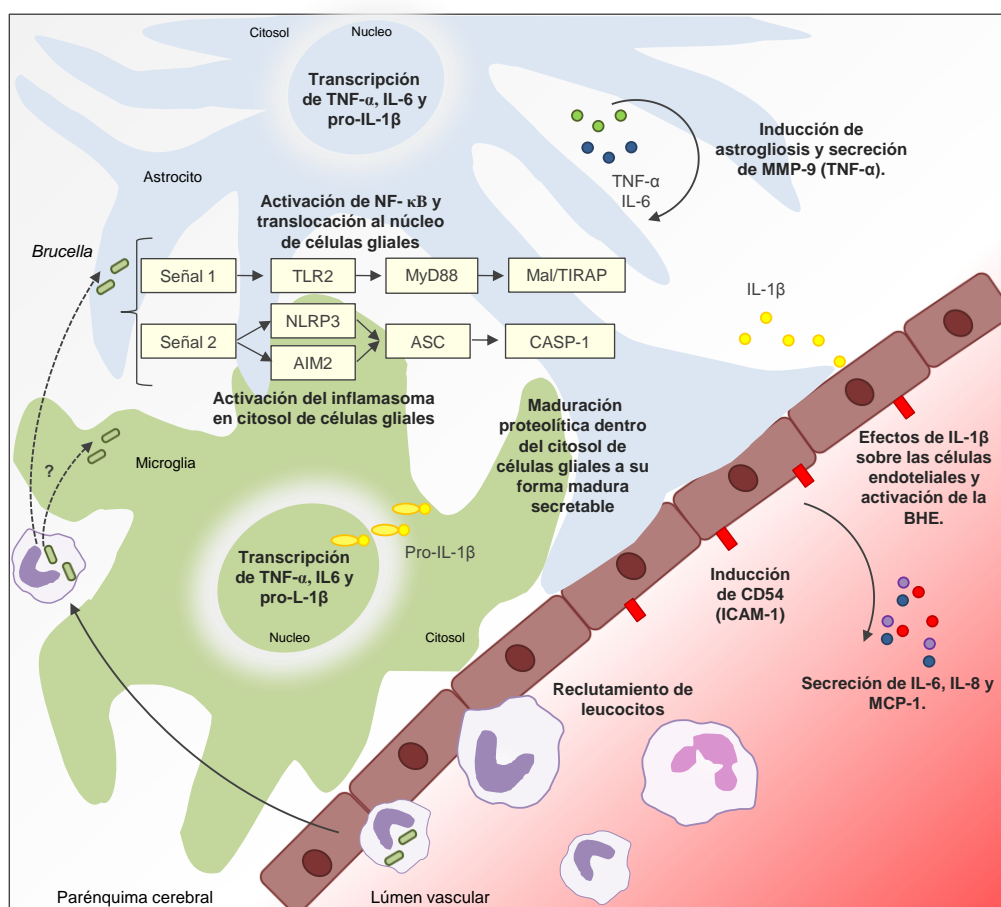


Ilustración 4. Modelo de inmunopatogenia de la neurobrucelosis.

# CONCLUSIONES FINALES

- A pesar de que *B. abortus* tiene la capacidad de infectar células endoteliales de la microvasculatura cerebral, la bacteria utiliza un mecanismo facilitado por monocitos infectados denominado "Caballo de Troya" para atravesar la BHE *in vitro*.
- La IL-1 $\beta$ , secretada por células gliales en respuesta a la infección con *B. abortus*, induce la activación de las HBMEC.
- La secreción de IL-1 $\beta$  por células gliales requiere de señalización a través de TLR2 y Mal/TIRAP como primera señal y del ensamblado de los inflamasomas AIM2 y NLRP3 como segunda señal para llevar a cabo la expresión de pro-IL-1 $\beta$  y su maduración proteolítica, respectivamente.
- La activación de las HBMEC por IL-1 $\beta$  promueve la migración transendotelial de monocitos y neutrófilos *in vitro*.
- La IL-1 $\beta$  es responsable de la presencia de infiltrados neutrofílicos en un modelo *in vivo* de infección.
- *B. abortus* induce la secreción de MMP-9 por astrocitos, siendo las lipoproteínas los componentes estructurales de la bacteria responsables de este fenómeno.
- TNF- $\alpha$  es la citoquina responsable de la secreción de MMP-9 por astrocitos.
- Las vías de Erk1/2 y p38 de las MAPK están implicadas tanto en la secreción de MMP-9 como de TNF- $\alpha$ .
- La presencia de MMP-9 en pacientes con neurobrucelosis demostró la relevancia clínica de este mediador inflamatorio.

---

Autora

Lic. María Cruz Miraglia

---

Director de Tesis

Dr. Guillermo H. Giambartolomei

# BIBLIOGRAFÍA

1. Pappas G, Papadimitriou P, Akritidis N, Christou L, Tsianos EV: **The new global map of human brucellosis**. *Lancet Infect Dis* 2006, **6**(2):91-99.
2. Samartino LE: **Brucellosis in Argentina**. *Vet Microbiol* 2002, **90**(1-4):71-80.
3. SENASA: **Informe del muestreo para determinación de prevalencias de brucelosis bovina en la zona de mayor producción bovina en la república argentina**. In. Buenos aires; 2014.
4. Letesson JJ, Lestrade P, Delrue RM, Danese I, Bellefontaine F, Fretin D, Taminiau B, Tibor A, Dricot A, Deschamps C *et al*: **Fun stories about Brucella: the "furtive nasty bug"**. *Vet Microbiol* 2002, **90**(1-4):317-328.
5. Whatmore AM: **Current understanding of the genetic diversity of Brucella, an expanding genus of zoonotic pathogens**. *Infect Genet Evol* 2009, **9**(6):1168-1184.
6. Foster G, Osterman BS, Godfroid J, Jacques I, Cloeckaert A: **Brucella ceti sp. nov. and Brucella pinnipedialis sp. nov. for Brucella strains with cetaceans and seals as their preferred hosts**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007, **57**(Pt 11):2688-2693.
7. Guzman-Verri C, Gonzalez-Barrientos R, Hernandez-Mora G, Morales JA, Baquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Moreno E: **Brucella ceti and brucellosis in cetaceans**. *Front Cell Infect Microbiol*, **2**:3.
8. Scholz HC, Hubalek Z, Sedlacek I, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Melzer F, Kampfer P, Neubauer H, Cloeckaert A *et al*: **Brucella microti sp. nov., isolated from the common vole Microtus arvalis**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2008, **58**(Pt 2):375-382.
9. Scholz HC, Hofer E, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Pfeiffer M, Kruger M, Cloeckaert A, Tomaso H: **Isolation of Brucella microti from mandibular lymph nodes of red foxes, Vulpes vulpes, in lower Austria**. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009, **9**(2):153-156.
10. Scholz HC, Hubalek Z, Nesvadbova J, Tomaso H, Vergnaud G, Le Fleche P, Whatmore AM, Al Dahouk S, Kruger M, Lodri C *et al*: **Isolation of Brucella microti from soil**. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**(8):1316-1317.
11. De BK, Stauffer L, Koylass MS, Sharp SE, Gee JE, Helsel LO, Steigerwalt AG, Vega R, Clark TA, Daneshvar MI *et al*: **Novel Brucella strain (BO1) associated with a prosthetic breast implant infection**. *J Clin Microbiol* 2008, **46**(1):43-49.
12. Scholz HC, Nockler K, Gollner C, Bahn P, Vergnaud G, Tomaso H, Al Dahouk S, Kampfer P, Cloeckaert A, Maquart M *et al*: **Brucella inopinata sp. nov., isolated from a breast implant infection**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2010, **60**(Pt 4):801-808.
13. Tiller RV, Gee JE, Lonsway DR, Gribble S, Bell SC, Jennison AV, Bates J, Coulter C, Hoffmaster AR, De BK: **Identification of an unusual Brucella strain (BO2) from a lung biopsy in a 52 year-old patient with chronic destructive pneumonia**. *BMC Microbiol* 2010, **10**:23.
14. Whatmore AM, Davison N, Cloeckaert A, Al Dahouk S, Zygmunt MS, Brew SD, Perrett LL, Koylass MS, Vergnaud G, Quance C *et al*: **Brucella papionis sp. nov., isolated from baboons (Papio spp.)**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2014, **64**(Pt 12):4120-4128.
15. Scholz HC, Revilla-Fernandez S, Al Dahouk S, Hammerl JA, Zygmunt MS, Cloeckaert A, Koylass M, Whatmore AM, Blom J, Vergnaud G *et al*: **Brucella vulpis sp. nov., isolated from mandibular lymph nodes of red foxes (Vulpes vulpes)**. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016, **66**(5):2090-2098.
16. Young EJ: **Human brucellosis**. *Rev Infect Dis* 1983, **5**(5):821-842.
17. Miraglia MC, Costa Franco MM, Rodriguez AM, Bellozi PMQ, Ferrari CC, Farias MI, Dennis VA, Barrionuevo P, de Oliveira ACP, Pitossi F *et al*: **Glial Cell-Elicited Activation of Brain Microvasculature in 2 Response to Brucella abortus Infection Requires ASC 3 Inflammasome-Dependent IL-1 $\beta$  Production**. *Journal of immunology (in-press)* 2016.
18. Sohn AH, Probert WS, Glaser CA, Gupta N, Bollen AW, Wong JD, Grace EM, McDonald WC: **Human neurobrucellosis with intracerebral granuloma caused by a marine mammal Brucella spp**. *Emerg Infect Dis* 2003, **9**(4):485-488.

19. Moriyon I, Lopez-Goni I: **Structure and properties of the outer membranes of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis*.** *Int Microbiol* 1998, **1**(1):19-26.
20. Cardoso PG, Macedo GC, Azevedo V, Oliveira SC: ***Brucella* spp noncanonical LPS: structure, biosynthesis, and interaction with host immune system.** *Microb Cell Fact* 2006, **5**:13.
21. Kreutzer DL, Robertson DC: **Surface macromolecules and virulence in intracellular parasitism: comparison of cell envelope components of smooth and rough strains of *Brucella abortus*.** *Infect Immun* 1979, **23**(3):819-828.
22. Moreno E, Berman DT, Boettcher LA: **Biological activities of *Brucella abortus* lipopolysaccharides.** *Infect Immun* 1981, **31**(1):362-370.
23. Goldstein J, Hoffman T, Frasch C, Lizzio EF, Beining PR, Hochstein D, Lee YL, Angus RD, Golding B: **Lipopolysaccharide (LPS) from *Brucella abortus* is less toxic than that from *Escherichia coli*, suggesting the possible use of *B. abortus* or LPS from *B. abortus* as a carrier in vaccines.** *Infect Immun* 1992, **60**(4):1385-1389.
24. Lapaque N, Moriyon I, Moreno E, Gorvel JP: ***Brucella* lipopolysaccharide acts as a virulence factor.** *Curr Opin Microbiol* 2005, **8**(1):60-66.
25. Winter AJ: **Outer membrane proteins of *Brucella*.** *Ann Inst Pasteur Microbiol* 1987, **138**(1):87-89.
26. Cloeckaert A, Vizcaino N, Paquet JY, Bowden RA, Elzer PH: **Major outer membrane proteins of *Brucella* spp.: past, present and future.** *Vet Microbiol* 2002, **90**(1-4):229-247.
27. Cloeckaert A, Verger JM, Grayon M, Vizcaino N: **Molecular and immunological characterization of the major outer membrane proteins of *Brucella*.** *FEMS Microbiol Lett* 1996, **145**(1):1-8.
28. Tibor A, Decelle B, Letesson JJ: **Outer membrane proteins Omp10, Omp16, and Omp19 of *Brucella* spp. are lipoproteins.** *Infect Immun* 1999, **67**(9):4960-4962.
29. Bae JE, Schurig GG, Toth TE: **Mice immune responses to *Brucella abortus* heat shock proteins. Use of baculovirus recombinant-expressing whole insect cells, purified *Brucella abortus* recombinant proteins, and a vaccinia virus recombinant as immunogens.** *Vet Microbiol* 2002, **88**(2):189-202.
30. Salhi I, Boigegrain RA, Machold J, Weise C, Cloeckaert A, Rouot B: **Characterization of new members of the group 3 outer membrane protein family of *Brucella* spp.** *Infect Immun* 2003, **71**(8):4326-4332.
31. Goolab S, Roth RL, van Heerden H, Crampton MC: **Analyzing the molecular mechanism of lipoprotein localization in *Brucella*.** *Front Microbiol* 2015, **6**:1189.
32. Rossetti CA, Drake KL, Siddavatam P, Lawhon SD, Nunes JE, Gull T, Khare S, Everts RE, Lewin HA, Adams LG: **Systems biology analysis of *Brucella* infected Peyer's patch reveals rapid invasion with modest transient perturbations of the host transcriptome.** *PLoS One* 2013, **8**(12):e81719.
33. de Figueiredo P, Ficht TA, Rice-Ficht A, Rossetti CA, Adams LG: **Pathogenesis and immunobiology of brucellosis: review of *Brucella*-host interactions.** *Am J Pathol* 2015, **185**(6):1505-1517.
34. Watarai M, Makino S, Michikawa M, Yanagisawa K, Murakami S, Shirahata T: **Macrophage plasma membrane cholesterol contributes to *Brucella abortus* infection of mice.** *Infect Immun* 2002, **70**(9):4818-4825.
35. Watarai M, Kim S, Erdenebaatar J, Makino S, Horiuchi M, Shirahata T, Sakaguchi S, Katamine S: **Cellular prion protein promotes *Brucella* infection into macrophages.** *J Exp Med* 2003, **198**(1):5-17.
36. Castaneda-Roldan EI, Avelino-Flores F, Dall'Agnol M, Freer E, Cedillo L, Dornand J, Giron JA: **Adherence of *Brucella* to human epithelial cells and macrophages is mediated by sialic acid residues.** *Cell Microbiol* 2004, **6**(5):435-445.
37. Kim S, Watarai M, Suzuki H, Makino S, Kodama T, Shirahata T: **Lipid raft microdomains mediate class A scavenger receptor-dependent infection of *Brucella abortus*.** *Microb Pathog* 2004, **37**(1):11-19.

38. Zygmunt MS, Jacques I, Bernardet N, Cloeckaert A: **Lipopolysaccharide heterogeneity in the atypical group of novel emerging Brucella species.** *Clin Vaccine Immunol* 2012, **19**(9):1370-1373.
39. Watarai M, Makino S, Fujii Y, Okamoto K, Shirahata T: **Modulation of Brucella-induced macropinocytosis by lipid rafts mediates intracellular replication.** *Cell Microbiol* 2002, **4**(6):341-355.
40. Pappas G, Akritidis N, Bosilkovski M, Tsianos E: **Brucellosis.** *N Engl J Med* 2005, **352**(22):2325-2336.
41. Delpino MV, Fossati CA, Baldi PC: **Proinflammatory response of human osteoblastic cell lines and osteoblast-monocyte interaction upon infection with Brucella spp.** *Infect Immun* 2009, **77**(3):984-995.
42. Delpino MV, Barrionuevo P, Scian R, Fossati CA, Baldi PC: **Brucella-infected hepatocytes mediate potentially tissue-damaging immune responses.** *J Hepatol* 2010, **53**(1):145-154.
43. Garcia Samartino C, Delpino MV, Pott Godoy C, Di Genaro MS, Pasquevich KA, Zwerdling A, Barrionuevo P, Mathieu P, Cassataro J, Pitossi F *et al.*: **Brucella abortus induces the secretion of proinflammatory mediators from glial cells leading to astrocyte apoptosis.** *Am J Pathol* 2010, **176**(3):1323-1338.
44. Arriola Benitez PC, Scian R, Comerchi DJ, Serantes DR, Vanzulli S, Fossati CA, Giambartolomei GH, Delpino MV: **Brucella abortus induces collagen deposition and MMP-9 down-modulation in hepatic stellate cells via TGF-beta1 production.** *Am J Pathol* 2013, **183**(6):1918-1927.
45. Detilleux PG, Deyoe BL, Cheville NF: **Penetration and intracellular growth of Brucella abortus in nonphagocytic cells in vitro.** *Infect Immun* 1990, **58**(7):2320-2328.
46. Pesce Viglietti AI, Arriola Benitez PC, Giambartolomei GH, Delpino MV: **Brucella abortus-infected B cells induce osteoclastogenesis.** *Microbes Infect* 2016.
47. Velasquez LN, Delpino MV, Ibanez AE, Coria LM, Miraglia MC, Scian R, Cassataro J, Giambartolomei GH, Barrionuevo P: **Brucella abortus induces apoptosis of human T lymphocytes.** *Microbes Infect* 2012, **14**(7-8):639-650.
48. Ferrero MC, Bregante J, Delpino MV, Barrionuevo P, Fossati CA, Giambartolomei GH, Baldi PC: **Proinflammatory response of human endothelial cells to Brucella infection.** *Microbes Infect* 2011, **13**(10):852-861.
49. Starr T, Ng TW, Wehrly TD, Knodler LA, Celli J: **Brucella intracellular replication requires trafficking through the late endosomal/lysosomal compartment.** *Traffic* 2008, **9**(5):678-694.
50. Boschirolu ML, Ouahrani-Bettache S, Foulongne V, Michaux-Charachon S, Bourg G, Allardet-Servent A, Cazevielle C, Liautard JP, Ramuz M, O'Callaghan D: **The Brucella suis virB operon is induced intracellularly in macrophages.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**(3):1544-1549.
51. O'Callaghan D, Cazevielle C, Allardet-Servent A, Boschirolu ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M: **A homologue of the Agrobacterium tumefaciens VirB and Bordetella pertussis Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of Brucella suis.** *Mol Microbiol* 1999, **33**(6):1210-1220.
52. Comerchi DJ, Martinez-Lorenzo MJ, Sieira R, Gorvel JP, Ugalde RA: **Essential role of the VirB machinery in the maturation of the Brucella abortus-containing vacuole.** *Cell Microbiol* 2001, **3**(3):159-168.
53. Roux CM, Rolan HG, Santos RL, Beremand PD, Thomas TL, Adams LG, Tsois RM: **Brucella requires a functional Type IV secretion system to elicit innate immune responses in mice.** *Cell Microbiol* 2007, **9**(7):1851-1869.
54. den Hartigh AB, Rolan HG, de Jong MF, Tsois RM: **VirB3 to VirB6 and VirB8 to VirB11, but not VirB7, are essential for mediating persistence of Brucella in the reticuloendothelial system.** *J Bacteriol* 2008, **190**(13):4427-4436.
55. Celli J, de Chastellier C, Franchini DM, Pizarro-Cerda J, Moreno E, Gorvel JP: **Brucella evades macrophage killing via VirB-dependent sustained interactions with the endoplasmic reticulum.** *J Exp Med* 2003, **198**(4):545-556.



56. Starr T, Child R, Wehrly TD, Hansen B, Hwang S, Lopez-Otin C, Virgin HW, Celli J: **Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle.** *Cell Host Microbe* 2012, **11**(1):33-45.
57. Jiang X, Leonard B, Benson R, Baldwin CL: **Macrophage control of Brucella abortus: role of reactive oxygen intermediates and nitric oxide.** *Cell Immunol* 1993, **151**(2):309-319.
58. Zwerdling A, Delpino MV, Pasquevich KA, Barrionuevo P, Cassataro J, Garcia Samartino C, Giambartolomei GH: **Brucella abortus activates human neutrophils.** *Microbes Infect* 2009, **11**(6-7):689-697.
59. Bertram TA, Canning PC, Roth JA: **Preferential inhibition of primary granule release from bovine neutrophils by a Brucella abortus extract.** *Infect Immun* 1986, **52**(1):285-292.
60. Barquero-Calvo E, Mora-Cartin R, Arce-Gorvel V, de Diego JL, Chacon-Diaz C, Chaves-Olarte E, Guzman-Verri C, Buret AG, Gorvel JP, Moreno E: **Brucella abortus Induces the Premature Death of Human Neutrophils through the Action of Its Lipopolysaccharide.** *PLoS Pathog* 2015, **11**(5):e1004853.
61. Barquero-Calvo E, Chaves-Olarte E, Weiss DS, Guzman-Verri C, Chacon-Diaz C, Rucavado A, Moriyon I, Moreno E: **Brucella abortus uses a stealthy strategy to avoid activation of the innate immune system during the onset of infection.** *PLoS One* 2007, **2**(7):e631.
62. Barquero-Calvo E, Martirosyan A, Ordonez-Rueda D, Arce-Gorvel V, Alfaro-Alarcon A, Lepidi H, Malissen B, Malissen M, Gorvel JP, Moreno E: **Neutrophils exert a suppressive effect on Th1 responses to intracellular pathogen Brucella abortus.** *PLoS Pathog* 2013, **9**(2):e1003167.
63. Billard E, Cazevieille C, Dornand J, Gross A: **High susceptibility of human dendritic cells to invasion by the intracellular pathogens Brucella suis, B. abortus, and B. melitensis.** *Infect Immun* 2005, **73**(12):8418-8424.
64. Salcedo SP, Marchesini MI, Lelouard H, Fugier E, Jolly G, Balor S, Muller A, Lapaque N, Demaria O, Alexopoulou L *et al*: **Brucella control of dendritic cell maturation is dependent on the TIR-containing protein Btp1.** *PLoS Pathog* 2008, **4**(2):e21.
65. Papadopoulos A, Gagnaire A, Degos C, de Chastellier C, Gorvel JP: **Brucella discriminates between mouse dendritic cell subsets upon in vitro infection.** *Virulence* 2015, **7**(1):33-44.
66. Zwerdling A, Delpino MV, Barrionuevo P, Cassataro J, Pasquevich KA, Garcia Samartino C, Fossati CA, Giambartolomei GH: **Brucella lipoproteins mimic dendritic cell maturation induced by Brucella abortus.** *Microbes Infect* 2008, **10**(12-13):1346-1354.
67. Fernandes DM, Benson R, Baldwin CL: **Lack of a role for natural killer cells in early control of Brucella abortus 2308 infections in mice.** *Infect Immun* 1995, **63**(10):4029-4033.
68. Salmeron I, Rodriguez-Zapata M, Salmeron O, Manzano L, Vaquer S, Alvarez-Mon M: **Impaired activity of natural killer cells in patients with acute brucellosis.** *Clin Infect Dis* 1992, **15**(5):764-770.
69. Gao N, Jennings P, Guo Y, Yuan D: **Regulatory role of natural killer (NK) cells on antibody responses to Brucella abortus.** *Innate Immun* 2011, **17**(2):152-163.
70. Dornand J, Lafont V, Oliaro J, Terraza A, Castaneda-Roldan E, Liautard JP: **Impairment of intramacrophagic Brucella suis multiplication by human natural killer cells through a contact-dependent mechanism.** *Infect Immun* 2004, **72**(4):2303-2311.
71. Bertotto A, Gerli R, Spinozzi F, Muscat C, Scalise F, Castellucci G, Sposito M, Candio F, Vaccaro R: **Lymphocytes bearing the gamma delta T cell receptor in acute Brucella melitensis infection.** *Eur J Immunol* 1993, **23**(5):1177-1180.
72. Kilic SS, Akbulut HH, Ozden M, Bulut V: **Gamma/delta T cells in patients with acute brucellosis.** *Clin Exp Med* 2009, **9**(2):101-104.
73. Skyberg JA, Thornburg T, Rollins M, Huarte E, Jutila MA, Pascual DW: **Murine and bovine gammadelta T cells enhance innate immunity against Brucella abortus infections.** *PLoS One* 2011, **6**(7):e21978.

74. Ottonnes F, Dornand J, Naroeni A, Liautard JP, Favero J: **V gamma 9V delta 2 T cells impair intracellular multiplication of *Brucella suis* in autologous monocytes through soluble factor release and contact-dependent cytotoxic effect.** *J Immunol* 2000, **165**(12):7133-7139.
75. Dudal S, Turriere C, Bessoles S, Fontes P, Sanchez F, Liautard J, Liautard JP, Lafont V: **Release of LL-37 by activated human Vgamma9Vdelta2 T cells: a microbicidal weapon against *Brucella suis*.** *J Immunol* 2006, **177**(8):5533-5539.
76. Kumar H, Kawai T, Akira S: **Pathogen recognition by the innate immune system.** *Int Rev Immunol* 2011, **30**(1):16-34.
77. Takeda K, Akira S: **Toll-like receptors.** *Curr Protoc Immunol* 2007, **Chapter 14**:Unit 14 12.
78. Muzio M, Polentarutti N, Bosisio D, Manoj Kumar PP, Mantovani A: **Toll-like receptor family and signalling pathway.** *Biochem Soc Trans* 2000, **28**(5):563-566.
79. Oliveira SC, de Oliveira FS, Macedo GC, de Almeida LA, Carvalho NB: **The role of innate immune receptors in the control of *Brucella abortus* infection: toll-like receptors and beyond.** *Microbes Infect* 2008, **10**(9):1005-1009.
80. Giambartolomei GH, Zwerdling A, Cassataro J, Bruno L, Fossati CA, Philipp MT: **Lipoproteins, not lipopolysaccharide, are the key mediators of the proinflammatory response elicited by heat-killed *Brucella abortus*.** *J Immunol* 2004, **173**(7):4635-4642.
81. de Almeida LA, Macedo GC, Marinho FA, Gomes MT, Corsetti PP, Silva AM, Cassataro J, Giambartolomei GH, Oliveira SC: **Toll-like receptor 6 plays an important role in host innate resistance to *Brucella abortus* infection in mice.** *Infect Immun* 2013, **81**(5):1654-1662.
82. Weiss DS, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A, Moreno E: **MyD88, but not toll-like receptors 4 and 2, is required for efficient clearance of *Brucella abortus*.** *Infect Immun* 2005, **73**(8):5137-5143.
83. Campos MA, Rosinha GM, Almeida IC, Salgueiro XS, Jarvis BW, Splitter GA, Qureshi N, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC: **Role of Toll-like receptor 4 in induction of cell-mediated immunity and resistance to *Brucella abortus* infection in mice.** *Infect Immun* 2004, **72**(1):176-186.
84. Huang L, Krieg AM, Eller N, Scott DE: **Induction and regulation of Th1-inducing cytokines by bacterial DNA, lipopolysaccharide, and heat-inactivated bacteria.** *Infect Immun* 1999, **67**(12):6257-6263.
85. Netea MG, van Deuren M, Kullberg BJ, Cavaillon JM, Van der Meer JW: **Does the shape of lipid A determine the interaction of LPS with Toll-like receptors?** *Trends Immunol* 2002, **23**(3):135-139.
86. Gomes MT, Campos PC, Pereira Gde S, Bartholomeu DC, Splitter G, Oliveira SC: **TLR9 is required for MAPK/NF-kappaB activation but does not cooperate with TLR2 or TLR6 to induce host resistance to *Brucella abortus*.** *J Leukoc Biol* 2015, **99**(5):771-780.
87. Huang LY, Ishii KJ, Akira S, Aliberti J, Golding B: **Th1-like cytokine induction by heat-killed *Brucella abortus* is dependent on triggering of TLR9.** *J Immunol* 2005, **175**(6):3964-3970.
88. Zhang CY, Bai N, Zhang ZH, Liang N, Dong L, Xiang R, Liu CH: **TLR2 signaling subpathways regulate TLR9 signaling for the effective induction of IL-12 upon stimulation by heat-killed *Brucella abortus*.** *Cell Mol Immunol*, **9**(4):324-333.
89. Terwagne M, Ferooz J, Rolan HG, Sun YH, Atluri V, Xavier MN, Franchi L, Nunez G, Legrand T, Flavell RA *et al*: **Innate immune recognition of flagellin limits systemic persistence of *Brucella*.** *Cell Microbiol* 2013, **15**(6):942-960.
90. Fretin D, Fauconnier A, Kohler S, Halling S, Leonard S, Nijskens C, Ferooz J, Lestrade P, Delrue RM, Danese I *et al*: **The sheathed flagellum of *Brucella melitensis* is involved in persistence in a murine model of infection.** *Cell Microbiol* 2005, **7**(5):687-698.
91. Oliveira SC, de Almeida LA, Carvalho NB, Oliveira FS, Lacerda TL: **Update on the role of innate immune receptors during *Brucella abortus* infection.** *Vet Immunol Immunopathol* 2012, **148**(1-2):129-135.

- 
92. Macedo GC, Magnani DM, Carvalho NB, Bruna-Romero O, Gazzinelli RT, Oliveira SC: **Central role of MyD88-dependent dendritic cell maturation and proinflammatory cytokine production to control *Brucella abortus* infection.** *J Immunol* 2008, **180**(2):1080-1087.
  93. Radhakrishnan GK, Yu Q, Harms JS, Splitter GA: ***Brucella* TIR Domain-containing Protein Mimics Properties of the Toll-like Receptor Adaptor Protein TIRAP.** *J Biol Chem* 2009, **284**(15):9892-9898.
  94. Cirli C, Wieser A, Yadav M, Duerr S, Schubert S, Fischer H, Stappert D, Wantia N, Rodriguez N, Wagner H *et al*: **Subversion of Toll-like receptor signaling by a unique family of bacterial Toll/interleukin-1 receptor domain-containing proteins.** *Nat Med* 2008, **14**(4):399-406.
  95. Salcedo SP, Marchesini MI, Degos C, Terwagne M, Von Bargen K, Lepidi H, Herrmann CK, Santos Lacerda TL, Imbert PR, Pierre P *et al*: **BtpB, a novel *Brucella* TIR-containing effector protein with immune modulatory functions.** *Front Cell Infect Microbiol* 2013, **3**:28.
  96. Stutz A, Golenbock DT, Latz E: **Inflammasomes: too big to miss.** *J Clin Invest* 2009, **119**(12):3502-3511.
  97. Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G: **The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis.** *Nat Immunol* 2009, **10**(3):241-247.
  98. Marrack P, McKee AS, Munks MW: **Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium.** *Nat Rev Immunol* 2009, **9**(4):287-293.
  99. Gomes MT, Campos PC, Oliveira FS, Corsetti PP, Bortoluci KR, Cunha LD, Zamboni DS, Oliveira SC: **Critical role of ASC inflammasomes and bacterial type IV secretion system in caspase-1 activation and host innate resistance to *Brucella abortus* infection.** *J Immunol* 2013, **190**(7):3629-3638.
  100. Zhan Y, Liu Z, Cheers C: **Tumor necrosis factor alpha and interleukin-12 contribute to resistance to the intracellular bacterium *Brucella abortus* by different mechanisms.** *Infect Immun* 1996, **64**(7):2782-2786.
  101. Zhan Y, Cheers C: **Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection.** *Infect Immun* 1995, **63**(4):1387-1390.
  102. Zhan Y, Kelso A, Cheers C: **Cytokine production in the murine response to brucella infection or immunization with antigenic extracts.** *Immunology* 1993, **80**(3):458-464.
  103. Rittig MG, Kaufmann A, Robins A, Shaw B, Sprenger H, Gerns D, Foulongne V, Rouot B, Dornand J: **Smooth and rough lipopolysaccharide phenotypes of *Brucella* induce different intracellular trafficking and cytokine/chemokine release in human monocytes.** *J Leukoc Biol* 2003, **74**(6):1045-1055.
  104. Skendros P, Boura P: **Immunity to brucellosis.** *Rev Sci Tech* 2013, **32**(1):137-147.
  105. Dorneles EM, Teixeira-Carvalho A, Araujo MS, Sriranganathan N, Lage AP: **Immune response triggered by *Brucella abortus* following infection or vaccination.** *Vaccine* 2015, **33**(31):3659-3666.
  106. Oliveira SC, Splitter GA: **CD8+ type 1 CD44hi CD45 RBlo T lymphocytes control intracellular *Brucella abortus* infection as demonstrated in major histocompatibility complex class I- and class II-deficient mice.** *Eur J Immunol* 1995, **25**(9):2551-2557.
  107. Splitter GA, Everlith KM: ***Brucella abortus* regulates bovine macrophage-T-cell interaction by major histocompatibility complex class II and interleukin-1 expression.** *Infect Immun* 1989, **57**(4):1151-1157.
  108. Ko J, Splitter GA: **Molecular host-pathogen interaction in brucellosis: current understanding and future approaches to vaccine development for mice and humans.** *Clin Microbiol Rev* 2003, **16**(1):65-78.
  109. Zhan Y, Cheers C: **Endogenous gamma interferon mediates resistance to *Brucella abortus* infection.** *Infect Immun* 1993, **61**(11):4899-4901.
  110. Brandao AP, Oliveira FS, Carvalho NB, Vieira LQ, Azevedo V, Macedo GC, Oliveira SC: **Host susceptibility to *Brucella abortus* infection is more pronounced in IFN-gamma knockout than IL-12/beta2-microglobulin double-deficient mice.** *Clin Dev Immunol*, 2012:589494.

111. Murphy EA, Sathiyaseelan J, Parent MA, Zou B, Baldwin CL: **Interferon-gamma is crucial for surviving a *Brucella abortus* infection in both resistant C57BL/6 and susceptible BALB/c mice.** *Immunology* 2001, **103**(4):511-518.
112. Giambartolomei GH, Delpino MV, Cahanovich ME, Wallach JC, Baldi PC, Velikovsky CA, Fossati CA: **Diminished production of T helper 1 cytokines correlates with T cell unresponsiveness to *Brucella* cytoplasmic proteins in chronic human brucellosis.** *J Infect Dis* 2002, **186**(2):252-259.
113. Rodriguez-Zapata M, Matias MJ, Prieto A, Jonde MA, Monserrat J, Sanchez L, Reyes E, De la Hera A, Alvarez-Mon M: **Human brucellosis is characterized by an intense Th1 profile associated with a defective monocyte function.** *Infect Immun* 2010, **78**(7):3272-3279.
114. Akbulut HH, Kilic SS, Bulut V, Ozden M: **Determination of intracellular cytokines produced by Th1 and Th2 cells using flow cytometry in patients with brucellosis.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005, **45**(2):253-258.
115. Rafiei A, Ardestani SK, Kariminia A, Keyhani A, Mohraz M, Amirkhani A: **Dominant Th1 cytokine production in early onset of human brucellosis followed by switching towards Th2 along prolongation of disease.** *J Infect* 2006, **53**(5):315-324.
116. Skendros P, Pappas G, Boura P: **Cell-mediated immunity in human brucellosis.** *Microbes Infect* 2011, **13**(2):134-142.
117. Jiang X, Baldwin CL: **Effects of cytokines on intracellular growth of *Brucella abortus*.** *Infect Immun* 1993, **61**(1):124-134.
118. Fernandes DM, Jiang X, Jung JH, Baldwin CL: **Comparison of T cell cytokines in resistant and susceptible mice infected with virulent *Brucella abortus* strain 2308.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 1996, **16**(3-4):193-203.
119. Zaitseva MB, Golding H, Betts M, Yamauchi A, Bloom ET, Butler LE, Stevan L, Golding B: **Human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cells express Th1-like cytokine mRNA and proteins following in vitro stimulation with heat-inactivated *Brucella abortus*.** *Infect Immun* 1995, **63**(7):2720-2728.
120. Durward M, Radhakrishnan G, Harms J, Bareiss C, Magnani D, Splitter GA: **Active evasion of CTL mediated killing and low quality responding CD8+ T cells contribute to persistence of brucellosis.** *PLoS One* 2012, **7**(4):e34925.
121. Elzer PH, Jacobson RH, Jones SM, Nielsen KH, Douglas JT, Winter AJ: **Antibody-mediated protection against *Brucella abortus* in BALB/c mice at successive periods after infection: variation between virulent strain 2308 and attenuated vaccine strain 19.** *Immunology* 1994, **82**(4):651-658.
122. Barrionuevo P, Cassataro J, Delpino MV, Zwerdling A, Pasquevich KA, Garcia Samartino C, Wallach JC, Fossati CA, Giambartolomei GH: ***Brucella abortus* inhibits major histocompatibility complex class II expression and antigen processing through interleukin-6 secretion via Toll-like receptor 2.** *Infect Immun* 2008, **76**(1):250-262.
123. Barrionuevo P, Delpino MV, Pozner RG, Velasquez LN, Cassataro J, Giambartolomei GH: ***Brucella abortus* induces intracellular retention of MHC-I molecules in human macrophages down-modulating cytotoxic CD8(+) T cell responses.** *Cell Microbiol* 2013, **15**(4):487-502.
124. Forestier C, Deleuil F, Lapaque N, Moreno E, Gorvel JP: ***Brucella abortus* lipopolysaccharide in murine peritoneal macrophages acts as a down-regulator of T cell activation.** *J Immunol* 2000, **165**(9):5202-5210.
125. Bellaire BH, Roop RM, 2nd, Cardelli JA: **Opsonized virulent *Brucella abortus* replicates within nonacidic, endoplasmic reticulum-negative, LAMP-1-positive phagosomes in human monocytes.** *Infect Immun* 2005, **73**(6):3702-3713.
126. Gamazo C, Winter AJ, Moriyon I, Riezu-Boj JI, Blasco JM, Diaz R: **Comparative analyses of proteins extracted by hot saline or released spontaneously into outer membrane blebs from field strains of *Brucella ovis* and *Brucella melitensis*.** *Infect Immun* 1989, **57**(5):1419-1426.
127. Seleem MN, Boyle SM, Sriranganathan N: **Brucellosis: a re-emerging zoonosis.** *Vet Microbiol* 2010, **140**(3-4):392-398.

128. Mailles A, Rautureau S, Le Horgne JM, Poignet-Leroux B, d'Arnoux C, Denetiere G, Faure M, Lavigne JP, Bru JP, Garin-Bastuji B: **Re-emergence of brucellosis in cattle in France and risk for human health.** *Euro Surveill* 2012, **17**(30).
129. Moreno E: **Retrospective and prospective perspectives on zoonotic brucellosis.** *Front Microbiol* 2014, **5**:213.
130. Park MY, Lee CS, Choi YS, Park SJ, Lee JS, Lee HB: **A sporadic outbreak of human brucellosis in Korea.** *J Korean Med Sci* 2005, **20**(6):941-946.
131. Rivera SA, Ramirez MC, Lopetegui IP: **Eradication of bovine brucellosis in the 10th Region de Los Lagos, Chile.** *Vet Microbiol* 2002, **90**(1-4):45-53.
132. Abriata G: **Boletín Epidemiológico Periódico N°33: Edición Especial Brucelosis.** Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación Argentina Buenos Aires 2005.
133. Corbel MJ: **Brucellosis: an overview.** *Emerg Infect Dis* 1997, **3**(2):213-221.
134. Madkour MM, Al-Moutaery KR, Al-Deeb S: **Neurobrucellosis.** In **Madkour's Brucellosis, 2nd Ed.** Berlin, Germany. p. 166-178: M.M. Madkour, ed. Springer-Verlag.; 2001.
135. Moral M: **Diagnóstico de brucelosis: Guía para el equipo de salud N°12.** . Dirección de Epidemiología- Ministerio de Salud de la Nación Argentina Buenos Aires 2013.
136. Pappas G, Panagopoulou P, Christou L, Akritidis N: **Brucella as a biological weapon.** *Cell Mol Life Sci* 2006, **63**(19-20):2229-2236.
137. Malik GM: **A clinical study of brucellosis in adults in the Asir region of southern Saudi Arabia.** *Am J Trop Med Hyg* 1997, **56**(4):375-377.
138. Fiori PL, Mastrandrea S, Rappelli P, Cappuccinelli P: **Brucella abortus infection acquired in microbiology laboratories.** *J Clin Microbiol* 2000, **38**(5):2005-2006.
139. Staszkiwicz J, Lewis CM, Colville J, Zervos M, Band J: **Outbreak of Brucella melitensis among microbiology laboratory workers in a community hospital.** *J Clin Microbiol* 1991, **29**(2):287-290.
140. Blasco JM, Diaz R: **Brucella melitensis Rev-1 vaccine as a cause of human brucellosis.** *Lancet* 1993, **342**(8874):805.
141. Montes J, Rodriguez MA, Martin T, Martin F: **Laboratory-acquired meningitis caused by Brucella abortus strain 19.** *J Infect Dis* 1986, **154**(5):915-916.
142. Vigeant P, Mendelson J, Miller MA: **Human to human transmission of Brucella melitensis.** *Can J Infect Dis* 1995, **6**(3):153-155.
143. Runnells R: **Brucellosis.** In: **Principios de Patología Veterinaria: Anatomía Patológica.** , 1ra Edición en Español, 9na Reimpresión edn; 1980.
144. Young EJ: **Clinical manifestations of human brucellosis.** In **Brucellosis: clinical and laboratory aspects.** Boca Raton. Fl. p. 97-126: E.J. Young and M.J. Corbel, eds. CRC Press.; 1989.
145. Serre A: **Immunology and pathophysiology of human brucellosis.** In: **Brucellosis Clinical and Laboratory Aspects.** p. 85. : Young, E. J. Corbel, M. J. ed. CRC Press; 1989.
146. Chevrel J, Riojas A, Lafargues JP, Sarlangue J, Barbier R: **[Osteoarticular brucellosis and signs of autoimmunity].** *Arch Pediatr* 2001, **8**(8):834-837.
147. Colmenero JD, Reguera JM, Fernandez-Nebro A, Cabrera-Franquelo F: **Osteoarticular complications of brucellosis.** *Ann Rheum Dis* 1991, **50**(1):23-26.
148. Priest JR, Low D, Wang C, Bush T: **Brucellosis and sacroiliitis: a common presentation of an uncommon pathogen.** *J Am Board Fam Med* 2008, **21**(2):158-161.
149. Khan MY, Mah MW, Memish ZA: **Brucellosis in pregnant women.** *Clin Infect Dis* 2001, **32**(8):1172-1177.

- 
150. Colmenero Jde D, Queipo-Ortuno MI, Maria Reguera J, Angel Suarez-Munoz M, Martin-Carballino S, Morata P: **Chronic hepatosplenic abscesses in Brucellosis. Clinico-therapeutic features and molecular diagnostic approach.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2002, **42**(3):159-167.
151. Bouza E, Garcia de la Torre M, Parras F, Guerrero A, Rodriguez-Creixems M, Gobernado J: **Brucellar meningitis.** *Rev Infect Dis* 1987, **9**(4):810-822.
152. Alba D, Torres E, Molina F, Vazquez JJ: **[Neutrophilic pleocytosis in brucella meningitis].** *Med Clin (Barc)* 1992, **99**(12):478.
153. Wallach JC, Baldi PC, Fossati CA: **Clinical and diagnostic aspects of relapsing meningoencephalitis due to Brucella suis.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2002, **21**(10):760-762.
154. Nichols E: **Meningo-encephalitis due to brucellosis with the report of a case in which B. abortus was recovered from the cerebrospinal fluid, and a review of the literature.** *Ann Intern Med* 1951, **35**(3):673-693.
155. Giambartolomei GH, Wallach JC, Baldi PC: **Neurobrucellosis.** In **Encephalitis: Diagnosis and Treatment.** New York. p. 255-272: Halperin J. ed. The Egerton Group; 2008.
156. al Deeb SM, Yaqub BA, Sharif HS, Phadke JG: **Neurobrucellosis: clinical characteristics, diagnosis, and outcome.** *Neurology* 1989, **39**(4):498-501.
157. Memish Z, Mah MW, Al Mahmoud S, Al Shaalan M, Khan MY: **Brucella bacteraemia: clinical and laboratory observations in 160 patients.** *J Infect* 2000, **40**(1):59-63.
158. Pappas G, Akritidis N, Christou L: **Treatment of neurobrucellosis: what is known and what remains to be answered.** *Expert Rev Anti Infect Ther* 2007, **5**(6):983-990.
159. Shakir RA, Al-Din AS, Araj GF, Lulu AR, Mousa AR, Saadah MA: **Clinical categories of neurobrucellosis. A report on 19 cases.** *Brain* 1987, **110** ( Pt 1):213-223.
160. Shakir RA: **Neurobrucellosis.** *Postgrad Med J* 1986, **62**(734):1077-1079.
161. Wallach JC, Giambartolomei GH, Baldi PC, Fossati CA: **Human infection with M- strain of Brucella canis.** *Emerg Infect Dis* 2004, **10**(1):146-148.
162. McLean DR, Russell N, Khan MY: **Neurobrucellosis: clinical and therapeutic features.** *Clin Infect Dis* 1992, **15**(4):582-590.
163. Nas K, Tasdemir N, Cakmak E, Kemaloglu MS, Bukte Y, Geyik MF: **Cervical intramedullary granuloma of Brucella: a case report and review of the literature.** *Eur Spine J* 2007, **16** Suppl 3:255-259.
164. Vajramani GV, Nagmoti MB, Patil CS: **Neurobrucellosis presenting as an intra-medullary spinal cord abscess.** *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 2005, **4**:14.
165. Sengoz G, Yasar KK, Yildirim F, Nazlican O: **Sensorineural hearing loss in neurobrucellosis.** *Neurosciences (Riyadh)* 2008, **13**(3):299-301.
166. Al-Sous MW, Bohlega SA, Al-Kawi MZ, McLean DR, Ghaus SN: **Polyradiculopathy. A rare complication of neurobrucellosis.** *Neurosciences (Riyadh)* 2003, **8**(1):46-49.
167. Namiduru M, Karaoglan I, Yilmaz M: **Guillain-Barre syndrome associated with acute neurobrucellosis.** *Int J Clin Pract* 2003, **57**(10):919-920.
168. Al-Eissa YA, Al-Herbish AS: **Severe hypertension: an unusual presentation of Guillain-Barre syndrome in a child with brucellosis.** *Eur J Pediatr* 1996, **155**(1):53-55.
169. Oliveri R, Matera G, Foca A, Zappia M, Aguglia U, Quattrone A: **Polyradiculoneuropathy with cerebrospinal fluid albuminocytological dissociation due to neurobrucellosis.** *Clin Infect Dis* 1996, **23**(4):833-834.
170. Bingol A, Togay-Isikay C: **Neurobrucellosis as an exceptional cause of transient ischemic attacks.** *Eur J Neurol* 2006, **13**(5):544-548.

- 
171. Kochar DK, Kumawat BL, Agarwal N, Shubhakaran, Aseri S, Sharma BV, Rastogi A: **Meningoencephalitis in brucellosis**. *Neurol India* 2000, **48**(2):170-173.
172. Lampron A, Elali A, Rivest S: **Innate immunity in the CNS: redefining the relationship between the CNS and its environment**. *Neuron* 2013, **78**(2):214-232.
173. Rubin LL, Staddon JM: **The cell biology of the blood-brain barrier**. *Annu Rev Neurosci* 1999, **22**:11-28.
174. Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, McNamara JO, Williams SM: **Neuroscience 2001**, 2nd edition. edn. Sunderland (MA): Sinauer Associates
175. Farina C, Aloisi F, Meinl E: **Astrocytes are active players in cerebral innate immunity**. *Trends Immunol* 2007, **28**(3):138-145.
176. Dong Y, Benveniste EN: **Immune function of astrocytes**. *Glia* 2001, **36**(2):180-190.
177. Eroglu C, Barres BA: **Regulation of synaptic connectivity by glia**. *Nature* 2010, **468**(7321):223-231.
178. Quiding-Jarbrink M, Smith DA, Bancroft GJ: **Production of matrix metalloproteinases in response to mycobacterial infection**. *Infect Immun* 2001, **69**(9):5661-5670.
179. Loov C, Hillered L, Ebendal T, Erlandsson A: **Engulfing astrocytes protect neurons from contact-induced apoptosis following injury**. *PLoS One*, **7**(3):e33090.
180. Ju SM, Song HY, Lee JA, Lee SJ, Choi SY, Park J: **Extracellular HIV-1 Tat up-regulates expression of matrix metalloproteinase-9 via a MAPK-NF-kappaB dependent pathway in human astrocytes**. *Exp Mol Med* 2009, **41**(2):86-93.
181. Barres BA: **The mystery and magic of glia: a perspective on their roles in health and disease**. *Neuron* 2008, **60**(3):430-440.
182. Abbott NJ: **Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability**. *J Anat* 2002, **200**(6):629-638.
183. Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD: **Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model**. *Brain Res* 1987, **433**(1):155-159.
184. Hayashi Y, Nomura M, Yamagishi S, Harada S, Yamashita J, Yamamoto H: **Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes**. *Glia* 1997, **19**(1):13-26.
185. Bechmann I, Galea I, Perry VH: **What is the blood-brain barrier (not)?** *Trends Immunol* 2007, **28**(1):5-11.
186. Attwell D, Buchan AM, Charpak S, Lauritzen M, Macvicar BA, Newman EA: **Glial and neuronal control of brain blood flow**. *Nature*, **468**(7321):232-243.
187. Aloisi F: **Immune function of microglia**. *Glia* 2001, **36**(2):165-179.
188. Carson MJ, Sutcliffe JG: **Balancing function vs. self defense: the CNS as an active regulator of immune responses**. *J Neurosci Res* 1999, **55**(1):1-8.
189. Svendsen CN: **The amazing astrocyte**. *Nature* 2002, **417**(6884):29-32.
190. Kotas ME, Medzhitov R: **Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility**. *Cell* 2015, **160**(5):816-827.
191. Kim KS: **Mechanisms of microbial traversal of the blood-brain barrier**. *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**(8):625-634.
192. Daneman R, Rescigno M: **The gut immune barrier and the blood-brain barrier: are they so different?** *Immunity* 2009, **31**(5):722-735.

- 
193. Bsibsi M, Ravid R, Gveric D, van Noort JM: **Broad expression of Toll-like receptors in the human central nervous system.** *J Neuropathol Exp Neurol* 2002, **61**(11):1013-1021.
194. Rosenzweig HL, Planck SR, Rosenbaum JT: **NLRs in immune privileged sites.** *Curr Opin Pharmacol* 2011, **11**(4):423-428.
195. Hanamsagar R, Hanke ML, Kielian T: **Toll-like receptor (TLR) and inflammasome actions in the central nervous system.** *Trends Immunol* 2012, **33**(7):333-342.
196. Lachenmaier SM, Deli MA, Meissner M, Liesenfeld O: **Intracellular transport of *Toxoplasma gondii* through the blood-brain barrier.** *J Neuroimmunol* 2011, **232**(1-2):119-130.
197. Tsai HC, Chung LY, Chen ER, Liu YC, Lee SS, Chen YS, Sy CL, Wann SR, Yen CM: **Association of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitors of metalloproteinase-4 in cerebrospinal fluid with blood-brain barrier dysfunction in patients with eosinophilic meningitis caused by *Angiostrongylus cantonensis*.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**(1):20-27.
198. Argaw AT, Zhang Y, Snyder BJ, Zhao ML, Kopp N, Lee SC, Raine CS, Brosnan CF, John GR: **IL-1 $\beta$  regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program.** *J Immunol* 2006, **177**(8):5574-5584.
199. Labus J, Hackel S, Lucka L, Danker K: **Interleukin-1 $\beta$  induces an inflammatory response and the breakdown of the endothelial cell layer in an improved human THBMEC-based in vitro blood-brain barrier model.** *J Neurosci Methods* 2014, **228**:35-45.
200. Landoni VI, Schierloh P, de Campos Nebel M, Fernandez GC, Calatayud C, Lapponi MJ, Isturiz MA: **Shiga toxin 1 induces on lipopolysaccharide-treated astrocytes the release of tumor necrosis factor- $\alpha$  that alter brain-like endothelium integrity.** *PLoS Pathog* 2012, **8**(3):e1002632.
201. Wosik K, Biernacki K, Khouzam MP, Prat A: **Death receptor expression and function at the human blood brain barrier.** *J Neurol Sci* 2007, **259**(1-2):53-60.
202. Lopez-Ramirez MA, Fischer R, Torres-Badillo CC, Davies HA, Logan K, Pfizenmaier K, Male DK, Sharrack B, Romero IA: **Role of caspases in cytokine-induced barrier breakdown in human brain endothelial cells.** *J Immunol* 2012, **189**(6):3130-3139.
203. Heidinger M, Kolb H, Krell HW, Jochum M, Ries C: **Modulation of autocrine TNF- $\alpha$ -stimulated matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) expression by mitogen-activated protein kinases in THP-1 monocytic cells.** *Biol Chem* 2006, **387**(1):69-78.
204. Arechavaleta-Velasco F, Ogando D, Parry S, Vadillo-Ortega F: **Production of matrix metalloproteinase-9 in lipopolysaccharide-stimulated human amnion occurs through an autocrine and paracrine proinflammatory cytokine-dependent system.** *Biol Reprod* 2002, **67**(6):1952-1958.
205. Simi A, Tsakiri N, Wang P, Rothwell NJ: **Interleukin-1 and inflammatory neurodegeneration.** *Biochem Soc Trans* 2007, **35**(Pt 5):1122-1126.
206. Zlokovic BV: **The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders.** *Neuron* 2008, **57**(2):178-201.
207. Galle C, Struelens M, Liesnard C, Godfroid J, Maes N, Dewitte O, Farber CM, Clevenbergh P, Van Vooren JP: ***Brucella melitensis* osteitis following craniotomy in a patient with AIDS.** *Clin Infect Dis* 1997, **24**(5):1012.
208. Drevets DA, Leenen PJ, Greenfield RA: **Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria.** *Clin Microbiol Rev* 2004, **17**(2):323-347.
209. Arenas GN, Staskevich AS, Aballay A, Mayorga LS: **Intracellular trafficking of *Brucella abortus* in J774 macrophages.** *Infect Immun* 2000, **68**(7):4255-4263.
210. Martinez-Chamorro E, Munoz A, Esparza J, Munoz MJ, Giangaspro E: **Focal cerebral involvement by neurobrucellosis: pathological and MRI findings.** *Eur J Radiol* 2002, **43**(1):28-30.



- 
211. Seidel G, Pardo CA, Newman-Toker D, Olivi A, Eberhart CG: **Neurobrucellosis presenting as leukoencephalopathy: the role of cytotoxic T lymphocytes.** *Arch Pathol Lab Med* 2003, **127**(9):e374-377.
212. Gorvel JP, Moreno E: **Brucella intracellular life: from invasion to intracellular replication.** *Vet Microbiol* 2002, **90**(1-4):281-297.
213. Mense MG, Borschel RH, Wilhelmsen CL, Pitt ML, Hoover DL: **Pathologic changes associated with brucellosis experimentally induced by aerosol exposure in rhesus macaques (*Macaca mulatta*).** *Am J Vet Res* 2004, **65**(5):644-652.
214. Lee KM, Chiu KB, Sansing HA, Didier PJ, Ficht TA, Arenas-Gamboa AM, Roy CJ, Maclean AG: **Aerosol-induced brucellosis increases TLR-2 expression and increased complexity in the microanatomy of astroglia in rhesus macaques.** *Front Cell Infect Microbiol* 2013, **3**:86.
215. Krishnan C, Kaplin AI, Graber JS, Darman JS, Kerr DA: **Recurrent transverse myelitis following neurobrucellosis: immunologic features and beneficial response to immunosuppression.** *J Neurovirol* 2005, **11**(2):225-231.
216. Inan AS, Ceran N, Erdem I, Engin DO, Senbayrak S, Ozyurek SC, Goktas P: **Neurobrucellosis with transient ischemic attack, vasculopathic changes, intracerebral granulomas and basal ganglia infarction: a case report.** *J Med Case Rep* 2010, **4**:340.
217. Adaletli I, Albayram S, Gurses B, Ozer H, Yilmaz MH, Gulsen F, Sirikci A: **Vasculopathic changes in the cerebral arterial system with neurobrucellosis.** *AJNR Am J Neuroradiol* 2006, **27**(2):384-386.
218. Velasco J, Bengoechea JA, Brandenburg K, Lindner B, Seydel U, Gonzalez D, Zahringer U, Moreno E, Moriyon I: **Brucella abortus and its closest phylogenetic relative, Ochrobactrum spp., differ in outer membrane permeability and cationic peptide resistance.** *Infect Immun* 2000, **68**(6):3210-3218.
219. Lara-Tejero M, Sutterwala FS, Ogura Y, Grant EP, Bertin J, Coyle AJ, Flavell RA, Galan JE: **Role of the caspase-1 inflammasome in Salmonella typhimurium pathogenesis.** *J Exp Med* 2006, **203**(6):1407-1412.
220. Rathinam VA, Jiang Z, Waggoner SN, Sharma S, Cole LE, Waggoner L, Vanaja SK, Monks BG, Ganesan S, Latz E *et al*: **The AIM2 inflammasome is essential for host defense against cytosolic bacteria and DNA viruses.** *Nat Immunol* 2010, **11**(5):395-402.
221. Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, Galgani JE, Stadler K, Mynatt RL, Ravussin E, Stephens JM, Dixit VD: **The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance.** *Nat Med* 2011, **17**(2):179-188.
222. Adachi O, Kawai T, Takeda K, Matsumoto M, Tsutsui H, Sakagami M, Nakanishi K, Akira S: **Targeted disruption of the MyD88 gene results in loss of IL-1- and IL-18-mediated function.** *Immunity* 1998, **9**(1):143-150.
223. Kuida K, Lippke JA, Ku G, Harding MW, Livingston DJ, Su MS, Flavell RA: **Altered cytokine export and apoptosis in mice deficient in interleukin-1 beta converting enzyme.** *Science* 1995, **267**(5206):2000-2003.
224. Franklin KBJ, Paxinos. G: **The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates.** San Diego: Academic Press; 1997.
225. Stins MF, Gilles F, Kim KS: **Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells.** *J Neuroimmunol* 1997, **76**(1-2):81-90.
226. Stins MF, Badger J, Sik Kim K: **Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells.** *Microb Pathog* 2001, **30**(1):19-28.
227. Nizet V, Kim KS, Stins M, Jonas M, Chi EY, Nguyen D, Rubens CE: **Invasion of brain microvascular endothelial cells by group B streptococci.** *Infect Immun* 1997, **65**(12):5074-5081.

228. Hibbs MS, Hasty KA, Seyer JM, Kang AH, Mainardi CL: **Biochemical and immunological characterization of the secreted forms of human neutrophil gelatinase.** *J Biol Chem* 1985, **260**(4):2493-2500.
229. Zhou M, Zhang Y, Ardans JA, Wahl LM: **Interferon-gamma differentially regulates monocyte matrix metalloproteinase-1 and -9 through tumor necrosis factor-alpha and caspase 8.** *J Biol Chem* 2003, **278**(46):45406-45413.
230. Green JA, Elkington PT, Pennington CJ, Roncaroli F, Dholakia S, Moores RC, Bullen A, Porter JC, Agranoff D, Edwards DR *et al*: **Mycobacterium tuberculosis upregulates microglial matrix metalloproteinase-1 and -3 expression and secretion via NF-kappaB- and Activator Protein-1-dependent monocyte networks.** *J Immunol*, **184**(11):6492-6503.
231. Gebbia JA, Coleman JL, Benach JL: **Borrelia spirochetes upregulate release and activation of matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) and collagenase 1 (MMP-1) in human cells.** *Infect Immun* 2001, **69**(1):456-462.
232. Ramesh G, Philipp MT: **Pathogenesis of Lyme neuroborreliosis: mitogen-activated protein kinases Erk1, Erk2, and p38 in the response of astrocytes to Borrelia burgdorferi lipoproteins.** *Neurosci Lett* 2005, **384**(1-2):112-116.
233. Baldi PC, Araj GF, Racaro GC, Wallach JC, Fossati CA: **Detection of antibodies to Brucella cytoplasmic proteins in the cerebrospinal fluid of patients with neurobrucellosis.** *Clin Diagn Lab Immunol* 1999, **6**(5):756-759.
234. Badger JL, Stins MF, Kim KS: **Citrobacter freundii invades and replicates in human brain microvascular endothelial cells.** *Infect Immun* 1999, **67**(8):4208-4215.
235. Prasadarao NV, Wass CA, Hacker J, Jann K, Kim KS: **Adhesion of S-fimbriated Escherichia coli to brain glycolipids mediated by sfaA gene-encoded protein of S-fimbriae.** *J Biol Chem* 1993, **268**(14):10356-10363.
236. Ferrero MC, Fossati CA, Rumbo M, Baldi PC: **Brucella invasion of human intestinal epithelial cells elicits a weak proinflammatory response but a significant CCL20 secretion.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2012, **66**(1):45-57.
237. Ferrero MC, Fossati CA, Baldi PC: **Smooth Brucella strains invade and replicate in human lung epithelial cells without inducing cell death.** *Microbes Infect* 2009, **11**(4):476-483.
238. Czibener C, Merwaiss F, Guaimas F, Del Giudice MG, Serantes DA, Spera JM, Ugalde JE: **BigA is a novel adhesin of Brucella that mediates adhesion to epithelial cells.** *Cell Microbiol* 2016, **18**(4):500-513.
239. Ferrero MC: **Estudio de la Interacción de Brucella spp. con la mucosa intestinal y respiratoria.** Buenos aires: UBA; 2010.
240. Guzman-Verri C, Chaves-Olarte E, von Eichel-Streiber C, Lopez-Goni I, Thelestam M, Arvidson S, Gorvel JP, Moreno E: **GTPases of the Rho subfamily are required for Brucella abortus internalization in nonprofessional phagocytes: direct activation of Cdc42.** *J Biol Chem* 2001, **276**(48):44435-44443.
241. Dando SJ, Mackay-Sim A, Norton R, Currie BJ, St John JA, Ekberg JA, Batzloff M, Ulett GC, Beacham IR: **Pathogens penetrating the central nervous system: infection pathways and the cellular and molecular mechanisms of invasion.** *Clin Microbiol Rev* 2014, **27**(4):691-726.
242. Castaneda-Roldan EI, Ouahrani-Bettache S, Saldana Z, Avelino F, Rendon MA, Dornand J, Giron JA: **Characterization of SP41, a surface protein of Brucella associated with adherence and invasion of host epithelial cells.** *Cell Microbiol* 2006, **8**(12):1877-1887.
243. Czibener C, Ugalde JE: **Identification of a unique gene cluster of Brucella spp. that mediates adhesion to host cells.** *Microbes Infect* 2012, **14**(1):79-85.
244. Stanimirovic D, Shapiro A, Wong J, Hutchison J, Durkin J: **The induction of ICAM-1 in human cerebrovascular endothelial cells (HCEC) by ischemia-like conditions promotes enhanced neutrophil/HCEC adhesion.** *J Neuroimmunol* 1997, **76**(1-2):193-205.

- 
245. Minagar A, Alexander JS: **Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis.** *Mult Scler* 2003, **9**(6):540-549.
246. Duchini A, Govindarajan S, Santucci M, Zampi G, Hofman FM: **Effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 on fluid-phase permeability and ammonia diffusion in CNS-derived endothelial cells.** *J Invest Med* 1996, **44**(8):474-482.
247. Baldi PC, Giambartolomei GH: **Immunopathology of Brucella infection.** *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2013, **8**(1):18-26.
248. Baldi PC, Giambartolomei GH: **Pathogenesis and pathobiology of zoonotic brucellosis in humans.** *Rev Sci Tech* 2013, **32**(1):117-125.
249. Ravindran J, Agrawal M, Gupta N, Rao PV: **Alteration of blood brain barrier permeability by T-2 toxin: Role of MMP-9 and inflammatory cytokines.** *Toxicology* 2011, **280**(1-2):44-52.
250. Alboni S, Cervia D, Sugama S, Conti B: **Interleukin 18 in the CNS.** *J Neuroinflammation*, **7**:9.
251. Yasuoka S, Kawanokuchi J, Parajuli B, Jin S, Doi Y, Noda M, Sonobe Y, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A: **Production and functions of IL-33 in the central nervous system.** *Brain Res* 2011, **1385**:8-17.
252. Hudson CA, Christophi GP, Gruber RC, Wilmore JR, Lawrence DA, Massa PT: **Induction of IL-33 expression and activity in central nervous system glia.** *J Leukoc Biol* 2008, **84**(3):631-643.
253. Delpino MV, Barrionuevo P, Macedo GC, Oliveira SC, Genaro SD, Scian R, Miraglia MC, Fossati CA, Baldi PC, Giambartolomei GH: **Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to Brucella abortus infection requires TLR2/MyD88-dependent TNF-alpha production.** *J Leukoc Biol* 2012, **91**(2):285-298.
254. Ramesh G, Borda JT, Dufour J, Kaushal D, Ramamoorthy R, Lackner AA, Philipp MT: **Interaction of the Lyme disease spirochete Borrelia burgdorferi with brain parenchyma elicits inflammatory mediators from glial cells as well as glial and neuronal apoptosis.** *Am J Pathol* 2008, **173**(5):1415-1427.
255. Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, De Simone EA, Vanzulli SI, Fossati CA, Baldi PC, Delpino MV: **Potential role of fibroblast-like synoviocytes in joint damage induced by Brucella abortus infection through production and induction of matrix metalloproteinases.** *Infect Immun* 2011, **79**(9):3619-3632.
256. Scian R, Barrionuevo P, Fossati CA, Giambartolomei GH, Delpino MV: **Brucella abortus invasion of osteoblasts inhibits bone formation.** *Infect Immun* 2012, **80**(7):2333-2345.
257. Deckert-Schluter M, Bluethmann H, Kaefer N, Rang A, Schluter D: **Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine Toxoplasma encephalitis.** *Am J Pathol* 1999, **154**(5):1549-1561.
258. Horng T, Barton GM, Flavell RA, Medzhitov R: **The adaptor molecule TIRAP provides signalling specificity for Toll-like receptors.** *Nature* 2002, **420**(6913):329-333.
259. Doran KS, Liu GY, Nizet V: **Group B streptococcal beta-hemolysin/cytolysin activates neutrophil signaling pathways in brain endothelium and contributes to development of meningitis.** *J Clin Invest* 2003, **112**(5):736-744.
260. Dietrich JB: **The adhesion molecule ICAM-1 and its regulation in relation with the blood-brain barrier.** *J Neuroimmunol* 2002, **128**(1-2):58-68.
261. Brinckerhoff CE, Matrisian LM: **Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002, **3**(3):207-214.
262. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H: **Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1477**(1-2):267-283.
263. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP: **Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.** *Eur J Cell Biol* 1997, **74**(2):111-122.

- 
264. Okamoto T, Akuta T, Tamura F, van Der Vliet A, Akaike T: **Molecular mechanism for activation and regulation of matrix metalloproteinases during bacterial infections and respiratory inflammation.** *Biol Chem* 2004, **385**(11):997-1006.
265. Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, Sorokin LM: **Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Exp Med* 2006, **203**(4):1007-1019.
266. Elkington PT, O'Kane CM, Friedland JS: **The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease.** *Clin Exp Immunol* 2005, **142**(1):12-20.
267. Novak U, Kaye AH: **Extracellular matrix and the brain: components and function.** *J Clin Neurosci* 2000, **7**(4):280-290.
268. Rosenberg GA: **Matrix metalloproteinases in neuroinflammation.** *Glia* 2002, **39**(3):279-291.
269. Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchozebrska-Jesioneck D, Rejdak K, Stryjecka-Zimmer M, Stelmasiak Z: **[Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis].** *Neurol Neurochir Pol* 2005, **39**(1):63-67.
270. Toft-Hansen H, Nuttall RK, Edwards DR, Owens T: **Key metalloproteinases are expressed by specific cell types in experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Immunol* 2004, **173**(8):5209-5218.
271. Matsuura E, Umehara F, Hashiguchi T, Fujimoto N, Okada Y, Osame M: **Marked increase of matrix metalloproteinase 9 in cerebrospinal fluid of patients with fungal or tuberculous meningoencephalitis.** *J Neurol Sci* 2000, **173**(1):45-52.
272. Rosenberg GA: **Matrix metalloproteinases biomarkers in multiple sclerosis.** *Lancet* 2005, **365**(9467):1291-1293.
273. Min H, Hong J, Cho IH, Jang YH, Lee H, Kim D, Yu SW, Lee S, Lee SJ: **TLR2-induced astrocyte MMP9 activation compromises the blood brain barrier and exacerbates intracerebral hemorrhage in animal models.** *Mol Brain* 2015, **8**:23.
274. Asahi M, Wang X, Mori T, Sumii T, Jung JC, Moskowitz MA, Fini ME, Lo EH: **Effects of matrix metalloproteinase-9 gene knock-out on the proteolysis of blood-brain barrier and white matter components after cerebral ischemia.** *J Neurosci* 2001, **21**(19):7724-7732.
275. Rivera-Marrero CA, Schuyler W, Roser S, Roman J: **Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of Mycobacterium tuberculosis.** *Microb Pathog* 2000, **29**(4):231-244.
276. Leib SL, Leppert D, Clements J, Tauber MG: **Matrix metalloproteinases contribute to brain damage in experimental pneumococcal meningitis.** *Infect Immun* 2000, **68**(2):615-620.
277. Rosenberg GA: **Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases.** *Lancet Neurol* 2009, **8**(2):205-216.
278. Hsieh HL, Lin CC, Shih RH, Hsiao LD, Yang CM: **NADPH oxidase-mediated redox signal contributes to lipoteichoic acid-induced MMP-9 upregulation in brain astrocytes.** *J Neuroinflammation* 2012, **9**:110.
279. Hsieh HL, Wang HH, Wu CY, Tung WH, Yang CM: **Lipoteichoic acid induces matrix metalloproteinase-9 expression via transactivation of PDGF receptors and NF-kappaB activation in rat brain astrocytes.** *Neurotox Res* 2010, **17**(4):344-359.
280. Scian R, Barrionuevo P, Giambartolomei GH, Fossati CA, Baldi PC, Delpino MV: **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor- and tumor necrosis factor alpha-mediated matrix metalloproteinase production by human osteoblasts and monocytes after infection with Brucella abortus.** *Infect Immun* 2011, **79**(1):192-202.
281. Giambartolomei GH, Dennis VA, Lasater BL, Philipp MT: **Induction of pro- and anti-inflammatory cytokines by Borrelia burgdorferi lipoproteins in monocytes is mediated by CD14.** *Infect Immun* 1999, **67**(1):140-147.

282. Schumann RR, Pfeil D, Freyer D, Buerger W, Lamping N, Kirschning CJ, Goebel UB, Weber JR: **Lipopolysaccharide and pneumococcal cell wall components activate the mitogen activated protein kinases (MAPK) erk-1, erk-2, and p38 in astrocytes.** *Glia* 1998, **22**(3):295-305.
283. Harris JE, Green JA, Elkington PT, Friedland JS: **Monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis regulate MAP kinase-dependent astrocyte MMP-9 secretion.** *J Leukoc Biol* 2007, **81**(2):548-556.
284. Arai K, Lee SR, Lo EH: **Essential role for ERK mitogen-activated protein kinase in matrix metalloproteinase-9 regulation in rat cortical astrocytes.** *Glia* 2003, **43**(3):254-264.
285. Lo EH, Wang X, Cuzner ML: **Extracellular proteolysis in brain injury and inflammation: role for plasminogen activators and matrix metalloproteinases.** *J Neurosci Res* 2002, **69**(1):1-9.
286. Sellner J, Leib SL: **In bacterial meningitis cortical brain damage is associated with changes in parenchymal MMP-9/TIMP-1 ratio and increased collagen type IV degradation.** *Neurobiol Dis* 2006, **21**(3):647-656.
287. Ricci S, Grandgirard D, Wenzel M, Braccini T, Salvatore P, Oggioni MR, Leib SL, Koedel U: **Inhibition of matrix metalloproteinases attenuates brain damage in experimental meningococcal meningitis.** *BMC Infect Dis* 2014, **14**:726.
288. Shukla V, Shakya AK, Shukla M, Kumari N, Krishnani N, Dhole TN, Misra UK: **Circulating levels of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases during Japanese encephalitis virus infection.** *Virusdisease* 2016, **27**(1):63-76.
289. Chang CY, Li JR, Chen WY, Ou YC, Lai CY, Hu YH, Wu CC, Chang CJ, Chen CJ: **Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-Infected astrocytes.** *Glia* 2015.
290. Roe K, Kumar M, Lum S, Orillo B, Nerurkar VR, Verma S: **West Nile virus-induced disruption of the blood-brain barrier in mice is characterized by the degradation of the junctional complex proteins and increase in multiple matrix metalloproteinases.** *J Gen Virol* 2012, **93**(Pt 6):1193-1203.
291. Azeh I, Mader M, Smirnov A, Beuche W, Nau R, Weber F: **Experimental pneumococcal meningitis in rabbits: the increase of matrix metalloproteinase-9 in cerebrospinal fluid correlates with leucocyte invasion.** *Neurosci Lett* 1998, **256**(3):127-130.
292. Feng S, Cen J, Huang Y, Shen H, Yao L, Wang Y, Chen Z: **Matrix metalloproteinase-2 and -9 secreted by leukemic cells increase the permeability of blood-brain barrier by disrupting tight junction proteins.** *PLoS One* 2011, **6**(8):e20599.
293. Sellebjerg F, Sorensen TL: **Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system.** *Brain Res Bull* 2003, **61**(3):347-355.
294. Wu CY, Hsieh HL, Jou MJ, Yang CM: **Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK and nuclear factor-kappa B in interleukin-1beta-induced matrix metalloproteinase-9 expression in rat brain astrocytes.** *J Neurochem* 2004, **90**(6):1477-1488.
295. Lahat N, Shapiro S, Froom P, Kristal-Boneh E, Inspector M, Miller A: **Inorganic lead enhances cytokine-induced elevation of matrix metalloproteinase MMP-9 expression in glial cells.** *J Neuroimmunol* 2002, **132**(1-2):123-128.
296. Harris JE, Fernandez-Vilaseca M, Elkington PT, Horncastle DE, Graeber MB, Friedland JS: **IFNgamma synergizes with IL-1beta to up-regulate MMP-9 secretion in a cellular model of central nervous system tuberculosis.** *Faseb J* 2007, **21**(2):356-365.
297. Jorens PG, Parizel PM, Demey HE, Smets K, Jadoul K, Verbeek MM, Wevers RA, Cras P: **Meningoencephalitis caused by Streptococcus pneumoniae: a diagnostic and therapeutic challenge. Diagnosis with diffusion-weighted MRI leading to treatment with corticosteroids.** *Neuroradiology* 2005, **47**(10):758-764.
298. Pintado V, Pazos R, Jimenez-Mejias ME, Rodriguez-Guardado A, Gil A, Garcia-Lechuz JM, Cabellos C, Chaves F, Domingo P, Ramos A *et al*: **Methicillin-resistant Staphylococcus aureus meningitis in adults: a multicenter study of 86 cases.** *Medicine (Baltimore)* 2012, **91**(1):10-17.

299. Dixit P, Garg RK, Malhotra HS, Jain A, Verma R, Sharma PK, Kumar N: **Cytokines and matrix metalloproteinases in the cerebrospinal fluid of patients with acute transverse myelitis: an outcome analysis.** *Inflamm Res* 2016, **65**(2):125-132.
300. Kim KS: **Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury.** *Nat Rev Neurosci* 2003, **4**(5):376-385.
301. Ferrieri P, Burke B, Nelson J: **Production of bacteremia and meningitis in infant rats with group B streptococcal serotypes.** *Infect Immun* 1980, **27**(3):1023-1032.
302. Vitry MA, Hanot Mambres D, Deghelt M, Hack K, Machelart A, Lhomme F, Vanderwinden JM, Vermeersch M, De Trez C, Perez-Morga D *et al*: **Brucella melitensis invades murine erythrocytes during infection.** *Infect Immun* 2014, **82**(9):3927-3938.
303. El Khoury J: **The blood-brain barrier and pathogens: Hadrian's Wall or a Dardanian gate?** *Virulence*, **3**(2):157-158.